

**CRISTINA CRESPO RODRIGUES**

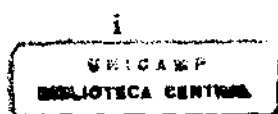
*Bióloga*

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS  
INTRACELULARES DE *Candida albicans* ISOLADAS DA  
CAVIDADE BUCAL E OUTROS SÍTIOS ANATÔMICOS DE  
HUMANOS**

*Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campinas, para  
obtenção do Título de MESTRE EM  
BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO-  
DENTAL.*

**Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling**  
*Titular da Disciplina de Microbiologia  
e Imunologia FOP-UNICAMP*

**PIRACICABA  
2001**





1150045893



FOP

T/UNICAMP R618p

**CRISTINA CRESPO RODRIGUES**

***Bióloga***

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS  
INTRACELULARES DE *Candida albicans* ISOLADAS DA  
CAVIDADE BUCAL E OUTROS SÍTIOS ANATÔMICOS DE  
HUMANOS**

*Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campinas, para  
obtenção do Título de MESTRE EM  
BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO-  
DENTAL.*

**Orientador:** *Prof. Dr. José Francisco Höfling  
Titular da Disciplina de Microbiologia  
e Imunologia FOP-UNICAMP*

**Banca Examinadora:**

*Prof. Dr. José Francisco Höfling  
Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo  
Profa. Dr. Silvia M. Guerra Molina*

Este exemplar foi devidamente corrigido.  
de acordo com: 1  
Assinatura: *[assinatura]*  
16.02.2001  
FOP-036/83

**PIRACICABA  
2001**

*J. 1649*

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
BIBLIOTECA

### Ficha Catalográfica

R618p      Rodrigues, Cristina Crespo.  
Perfil eletroforético de proteínas intracelulares de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal e outros sítios anatômicos de humanos. / Cristina Crespo Rodrigues. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.  
xii, 79f. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Francisco Höfling.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Análise numérica. 2. Eletroforese. 3. Proteínas – Análise. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 01 de Março de 2001, considerou a candidata CRISTINA CRESPO RODRIGUES aprovada.

1. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

Handwritten signature of Jose Francisco Hofling.

2. Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

Handwritten signature of Ricardo Antunes de Azevedo.

3. Profa. Dra. SILVIA MARIA GUERRA MOLINA

Handwritten signature of Silvia Maria Guerra Molina.

## DEDICATÓRIA

*... Ao meu pai Antonio e à minha mãe Maria por tudo que representam em minha vida, pelo amor, pela dedicação, pela educação, pelos ensinamentos, pelas noites sem dormir, pelas brigas na hora certa. Tenha certeza que tanto eu quanto meus irmãos sentimos orgulho em sermos seus filhos.*

*... Aos meus sobrinhos, Victor, Bárbara, Leticia e Vintcius (Pivo), verdadeiros anjinhos sem asas.*

*Amo vocês...*



*Dedico este trabalho*

*... a minha vó Maximina "in memoriam".*

*Exemplo de luta, exemplo de coragem, exemplo de  
mulher, minha inspiração!*

*Tenho certeza, que apesar de não estar mais aqui,  
sentiria orgulho deste trabalho.*

*Sinto sua falta...*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*...ao Prof. Dr. José Francisco Höfling, pela oportunidade do curso de mestrado, pela orientação atenta e competente no desenvolvimento dessa pesquisa e por todos os momentos em que foi bem mais que um orientador.*

*... ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela co-orientação segura e competente deste trabalho, pela acolhida amiga, sincera e paternal que sempre teve comigo, pelos conselhos profissionais em momentos difíceis, pelas conversas amigas, enfim por tudo.*

*Minha eterna  
gradidão*

# AGRADECIMENTOS

*Graças à vida e obrigada à Inteligência Superior pela inspiração, saúde e satisfação pessoal na realização deste trabalho.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro destinado à esse trabalho.*

*Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Prof. Carlos R. H. Fortinguerra "in memoriam" e à Profa. Darcy O. Josello.*

*Aos Professores Silvia Maria G. Molina (ESALQ/USP) e Celso Paulino da Costa (FOP/UNICAMP), por terem aceitado avaliar este trabalho de tese.*

*Aos Professores, alunos e funcionários do Departamento de Genética - ESALQ/USP.*

*Aos meus irmãos Ronaldo, Luciano e Sandra, que sempre estão comigo em todos os momentos no meu coração.*

*Aos meus tios Antonio e Carmen por não limitar-se em serem apenas meus tios, mas também amigos, meu porto seguro nas horas de dificuldade. Fiquem certo de minha eterna gratidão.*

*Aos meus amigos Rico, Renato, Salete, Pat, Gui, Angela, Léo (Pit Bull), Hátia, Paula, Vanderlei "Luxemburgo", Alejandro e Pepsi, pela*



*convivência no cotidiano do laboratório, amizade e incentivo em todos os momentos.*

*À Sueli "Barbie" e Simone, amigas de infância, que, tenho certeza, são para sempre.*

*À minha prima Cidinha "mandioca" e minha amiga Janaina (Jã), por muitos momentos de alegria e pelo apoio nas situações difíceis.*

*Aos amigos Ariel e Renato, pelos famosos "eventos".*

*Ao amigo Fernando (uruguaio), pela força e amizade.*

*Ao Dr. Luis H. Gomes (ESALQ-USP), pela colaboração neste trabalho e amizade.*

*Ao amigo Wellington (GENÉTICA-ESALQ), por ser solidário em todos os momentos.*

*Aos amigos do Departamento de Microbiologia/FOP /UNICAMP, Cássio, Magda, Marcelo, Meire e Anderson "menininho".*

*Ao Sidnei, que tornou minhas viagens Pira - Btu mais agradáveis.*

*A todas as pessoas que não foram mencionadas mas que auxiliaram de alguma forma para que esse trabalho pudesse ser realizado com êxito.*

*Meus sinceros agradecimentos*

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	1
1. Figuras.....	1
2. Tabelas .....	2
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
1. Procedência das amostras.....	25
2. Manutenção das amostras.....	27
3. Padronização da extração das proteínas de componentes intracelulares .....	27
4. Extração de proteínas intracelulares da <i>Candida albicans</i> .....	28
5. Determinação da concentração protéica dos extratos de <i>C. albicans</i> .....	29
6. Desnaturação das proteínas das amostras de <i>C. albicans</i> .....	29
7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	30
8. Análise numérica dos perfis eletroforéticos das proteínas totais de <i>C. albicans</i> obtidos por SDS-PAGE.....	31
8.1 Processamento das imagens .....	31
8.2 Construção da matriz de similaridade.....	32

8.3 Construção do dendrograma de similaridade .....	32
---	----

## **RESULTADOS.....34**

1. Análise dos dendrogramas de similaridade .....	34
1.2 Análise dos dendrogramas de similaridade dos isolados pertencentes ao mesmos sítios anatômicos.....	35
1.3 Perfis protéicos em SDS-PAGE de amostras pertencentes a diferentes sítios anatômicos .....	49
1.4 Matriz de similaridade das amostras pertencentes a diferentes sítios anatômicos .....	50
1.5 Análise do dendrograma de similaridade dos isolados pertencentes a diferentes sítios anatômicos.....	51

## **DISCUSSÃO.....53**

## **CONCLUSÃO ..... 59**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....60**

## **APÊNDICES ..... 74**

1. Meios de Cultura.....	74
1.1 Meio Completo para Leveduras (MCL).....	74
1.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD).....	74
2. Soluções para eletroforese.....	75
3. Acrilamida/Bis (30% T; 2,6%C) .....	75
2.1 Gel Separador (Running Gel) a 10% .....	75
2.2 Gel Concentrador (Stacking Gel) a 4%.....	76
2.3 Persulfato de Amônia 10%.....	76
2.4 Reagente de BRADFORD (1976) .....	76
2.5 SDS 10% .....	77

2.6 Solução Corante.....	77
2.7 Solução Descorante.....	77
2.9 Tampão Dissociante de ALFENAS <i>et al.</i> (1991).....	77
2.10 Tampão do gel separador .....	78
2.11 Tampão do gel concentrador .....	78
2.12 Tampão de Tanque (Eletrodo): Tris-Glicina pH 8,9 (10X) .....	79

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## 1. Figuras

Figura 1. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas da Cavidade Bucal de indivíduos com H.I.V .....	35
Figura 2. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de material de Lavado Brônquico .....	36
Figura 3. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de material de Hemocultura.....	37
Figura 4. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de material de Secreção de Orofaringe.....	38
Figura 5. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de material de Urina .....	39
Figura 6. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de material de Secreção Traqueal.....	40
Figura 7. Dendrograma de similaridade para a linhagem de <i>C. albicans</i> isolada de Secreção Abdominal.....	41
Figura 8. Dendrograma de similaridade para a linhagem de <i>C. albicans</i> isolada de material de Dreno .....	42
Figura 9. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas da Cavidade Bucal.....	43
Figura 10. Dendrograma de similaridade para a linhagem de <i>C. albicans</i> isolada de material de Escarro .....	44
Figura 11. Dendrograma de similaridade para a linhagem de <i>C. albicans</i> isolada de material de Secreção Pulmonar.....	45
Figura 12. Dendrograma de similaridade para a linhagem de <i>C. albicans</i> isolada de material de Sonda Vesical.....	46
Figura 13. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de material de Secreção Vaginal.....	47

Figura 14. Dendrograma de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de material de Saliva .....	48
Figura 15. Perfis protéicos das linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de diferentes Sítios Anatômicos.....	49
Figura 16. Perfis protéicos das linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de diferentes Sítios Anatômicos.....	50
Figura 17. Dendrograma final de similaridade para as linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de diferentes Sítios Anatômicos.....	51

## 2. TABELAS

Tabela 1. Relação das amostras isoladas de diferentes Sítios Anatômicos utilizadas nos experimentos .....	26
Tabela 2. Matriz de similaridade (S) para quatorze amostras das linhagens de <i>C. albicans</i> isoladas de diferentes Sítios Anatômicos juntamente com a linhagem padrão CBS-562 ..	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

**[<sup>35</sup>S]** *Isótopo 35 do Enxofre*

**µg** *Micrograma*

**µL** *Microlitro*

**°C** *Escala Célcus de Temperatura*

**≥** *Maior ou Igual*

**A.L.** *Adolfo Lutz*

**C** *Matriz Cofenética*

**CBS** *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands*

**C.L** *Classes*

**cm** *Centímetros*

**DNA** *Ácido Desoxirribonucleico*

**g** *Gramma - Unidade de Massa*

**g** *Gravidade - Unidade de Força Centrífuga*

**HCL** *Ácido Clorídrico*

**LB.** *Instituto de Biociências*

**kDa** *Kilodaltons*

**L.C.** *Laboratório Clínico*

**M.M** *Massas Moleculares*

**M.C.L** *Meio Completo para Levedura*

**mg** *Miligramma*

**mL** *Mililitro*

**mm** *Milímetro*

**NTSYS-pc** *Sistema de Análise Multivariada e Taxonomia Numérica - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - personal computer*

**P** *Previlab*

**PAGE** *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**pH** *Potencial Hidrogeniônico*

**q.s.p.** *Quantidade Suficiente Para*

**RAPD** *Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso ( do inglês: Random Amplified Polymorphic DNA )*

**RFLP** *Restriction Endonucleasis Analysis*

**rpm** *Rotações por Minuto*

**RNA** *Ácido Ribonucléico*

**S** *Matriz de Similaridade*

**SAHN** *Desempenho Sequencial de Aglomeração Hierárquica de Grupos ( do inglês: Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested )*

**S<sub>SM</sub>** *Coeficiente de Similaridade Cofenética "Simple Matching"*

**SDS** *Dodecil Sulfato de Sódio - Sodium Dodecyl Sulfate*

**TEMED** *Tetrametiletilenodiamina*

**UPGMA** *Agrupamento Pareado sem Peso com Significado Aritmético - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*

**YPD** *Meio Extrato de Leveduras, Peptona e Glucose - Yeasts Peptone Dextrose*



## RESUMO

Amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral e de diferentes sítios anatômicos de humanos, foram estudadas. O propósito da presente pesquisa foi analisar os graus de similaridade entre esses isolados, através da técnica de eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida, em sistema descontinuo (SDS-PAGE). As amostras foram inoculadas em 50 mL de meio de cultura YPD. Decorrido o tempo de inoculação, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g, por 5 minutos e os sedimentos obtidos foram ressuspensos em água destilada gelada, lavados e fracionados em alíquotas de 0,5 mL, os quais foram submetidos ao processo de extração de proteínas por nitrogênio líquido. Os extratos celulares foram submetidos à técnica de SDS-PAGE e após a corrida eletroforética os géis foram revelados e as bandas protéicas foram submetidas a análise computacional no pacote estatístico NTSYS-pc 1.70 empregando-se o programa QUALITATIVE e o *coeficiente de similaridade SM* (Simple Matching Coefficient). Essas matrizes de similaridade foram tratadas pelo algoritmo UPGMA, a qual gerou os dendrogramas que possibilitaram as análises dos graus de similaridade existentes entre os isolados de *C. albicans*.

A análise dos perfis eletroforéticos de extratos protéicos de isolados de *C. albicans* da cavidade bucal e outros sítios anatômicos de humanos, originou diversos dendrogramas, o qual permitiu o agrupamento dos isolados em grupos representativos da espécie.

As amostras de *C. albicans*, de um mesmo sítio anatômico, quando comparadas, apresentaram valores de similaridade acima de 80% ( $S_{SM} = 0,800$ ), os quais suportam o agrupamento dentro de uma mesma espécie.

As amostras de *C. albicans* em conjunto, envolvendo a linhagem-tipo CBS-562, juntamente com as 14 amostras analisadas (uma de cada sítio anatômico) escolhidas aleatoriamente, apresentaram um alto grau de coeficiente de similaridade, quando comparadas.

A composição dos "clusters" presentes nos dendrogramas resultantes da análise dos perfis protéicos das diversas amostras analisadas, independeram dos fatores estudados, como sítios anatômicos e indivíduos.

## ABSTRACT

Samples of *Candida albicans* isolated from the human oral cavities and other anatomic sites, were studied. The purpose of the present research was to study the degree of similarity among these isolates through the whole-cell polyacrylamide gel electrophoresis technique (SDS-PAGE). The samples were inoculated in YPD culture medium, and after the incubation, they were centrifuged at  $3,000 \times g$  for 5 minutes, with the sediments were washed in cold distilled water and whole-cell proteins were extracted in liquid nitrogen. The cell extracts were submitted to SDS-PAGE technique and after the electrophoresis, the gels were revealed and the protein bands were submitted to computational analysis on the NTSYS-pc 1.70 version statistical package applying the *coefficient similarity SM* (Simple Matching Coefficient). Those similarity matrices were treated by the UPGMA algorithm, allowing the analyses of similarity levels among *C. albicans* isolates by dendrograms. The electrophoretic analysis of the *C. albicans* proteins extracts isolated from oral cavities and others human anatomics sites, allowed the construction of dendrograms including clustering of isolates in representatives groups of species. Samples of *C. albicans* species of the same anatomic site showed similarity values up 80% ( $S_{SM} = 0,800$ ) supporting the species grouping. Whole sample of these organisms (all anatomic sites) selected randomly including the type-strain CBS-562 showed high similarity. The clusters composition expressed by the dendrograms of all the sample were not dependent of factor as: anatomic sites and studied persons.

## INTRODUÇÃO

As leveduroses, em especial do gênero *Candida*, estão amplamente distribuídas na natureza, podendo algumas viverem de modo saprófita ou parasitária no organismo do homem e de outros animais de sangue quente (LACAZ *et al.*, 1980; BUDTZ-JORGENSEN, 1990).

Como fungo oportunista, as leveduras principalmente a espécie *Candida albicans*, aproveitam-se de alterações em hospedeiros debilitados e através de mecanismos patogênicos, rompem o equilíbrio entre parasita e hospedeiro, causando infecção, vindo a assumir um relevante papel pelo advento e uso indiscriminado de antibióticos de última geração, drogas imunossupressoras e situações onde o paciente se torne vulnerável, como em internações com intubação prolongada, transplante de órgãos, leucemias, infecções por HIV, uso de prótese, etc.

A *C. albicans* também pode ser encontrada em indivíduos sadios. As causas de sua presença em portadores sadios não estão claramente definidas, porém, sugere-se que fatores nutricionais, interações com a microbiota bacteriana e presença de anticorpos específicos na saliva, possam contribuir para sua compreensão (JENKINS, 1977; STENDERUP, 1990).

A importância médica das infecções causadas por *C. albicans* e o valor científico dessas leveduras, como um modelo para a compreensão do desenvolvimento celular fúngico, têm estimulado estudos com ênfase na taxonomia, epidemiologia, patogenia, genética e bioquímica desses microrganismos.

Nas últimas décadas, várias técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de ampliar o conhecimento desses microrganismos. Vários pesquisadores (SHECHTER, 1973; HALL, 1973; VANCANNEYT *et al.*, 1991) têm utilizado a análise de proteínas, na taxonomia dos fungos, tendo em vista que cada proteína é codificada por uma sequência de aminoácidos controlados por um gene. Ao se comparar a estrutura desses componentes, está-se comparando indiretamente a própria estrutura do material genético expresso, avaliando-se dessa forma, as relações fenético-taxonômicas dos grupos. As proteínas podem ser analisadas por diversos métodos, incluindo-se entre eles a determinação de sua estrutura primária (composição de aminoácidos, sequência dos aminoácidos e padrões digitais dos peptídios), pela eletroforese, pela cromatografia e por outras técnicas baseadas em suas propriedades físicas, imunológicas ou catalíticas.

Dentre as técnicas disponíveis, a que vem sendo mais utilizada é a eletroforese em suporte de gel. Variações dessa técnica têm permitido a caracterização de leveduras através da análise de substâncias de natureza diversas, tais como cromossomos (ASAKURA *et al.*, 1991; MONOD *et al.*, 1990), fragmentos de DNA (SCHERER & STEVENS, 1987), isoenzimas (LEHMANN *et al.*, 1889), glicoproteínas (CASANOVA & CHAFFIN, 1991) e proteínas totais desnaturadas (SHEN *et al.*, 1988; BRUNEAU & GUINET, 1989; MAIDEN & TANNER, 1991). Referente a essa última técnica, sabe-se que a mesma tem sido empregada satisfatoriamente na caracterização de bactérias (TANNER *et al.*, 1986; COSTAS *et al.*, 1989a; HOLMES *et al.*, 1990) e de leveduras (VANCANNEYT *et al.*, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1992; ROSA, 1997).

Os perfis eletroforéticos resultantes da separação das proteínas, podem ser plotados numa matriz de dados binários, que com auxílio de sistemas computadorizados, fornecem resultados comparativos, na forma de matrizes ou fenogramas de similaridade, os quais permitem avaliar os diferentes graus de similaridade fenética ou correlações cofenéticas entre linhagens de uma mesma espécie. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) produz, em condições padronizadas, um padrão de bandas bastante complexo (chamado de eletroforegrama protéico ou padrão eletroforético de proteínas) o qual pode ser considerado um "padrão digital" ou uma "assinatura" do isolado investigado (KERSTERS, 1985).

O propósito da presente pesquisa é analisar as correlações fenéticas existentes entre isolados de *C. albicans* (Berkout) da cavidade bucal e outros sítios anatômicos de indivíduos diversos, com base no perfil eletroforético de proteínas intracelulares desnaturadas em gel de poliacrilamida, em sistema descontínuo (SDS-PAGE), com ênfase nos estudos que envolvem identificação, caracterização taxonômica, e epidemiologia desses microrganismos.

## REVISÃO DE LITERATURA

Há cerca de 10 milhões de espécies de organismos vivos no mundo, incluindo milhares de espécies microbianas. A necessidade de organizar esta quantidade e variedade de organismos, se torna imprescindível nos estudos biológicos com esses seres vivos.

A ciência que tem como objetivo tentar ordenar o caos aparente da diversidade biológica é a Taxonomia (“taxis” arranjo e “nomos” lei). A taxonomia procura ordenar as espécies dentro de um sistema, pelo conhecimento do maior número de caracteres, de maneira a evidenciar não só suas afinidades naturais e relações de parentesco, como também a ordem filogenética das mesmas.

Para que ocorra uma denominação única e internacional, os organismos recebem nomes científicos (latinos ou latinizados), cuja aplicação é regulamentada pelo Código Internacional de Nomenclatura, destacando-se as regras do exemplar-tipo ( “type strain” ), da prevalência do nome mais antigo, da combinação binária do gênero e da espécie, seguido do autor e da regra da prioridade, no caso de outros autores (SNEATH, 1984). As chaves de identificação e descrição de grupos taxonômicos são encontradas em tratados Internacionais de referência como o “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (KRIEG & HOLT, 1984), e o “The Yeast, a taxonomic Study” (KREGER VAN RIJ, 1984), usados respectivamente na taxonomia de bactérias e leveduras.

Copeland (cf. WHITTAKER, 1989), em 1938, reuniu no mesmo reino os organismos unicelulares procariotos e eucariotos, criando um esquema de quatro reinos: Micota ou Monera, Protista, Plantae e Animalia, incluindo todos os organismos vivos, com exceção dos vírus. WHITTAKER (1969), estudando a classificação dos seres vivos, os reuniu em um sistema baseado em três níveis de organização, segundo o modo de nutrição, dividindo-os em cinco reinos, sendo estes modificados por MARGULIS (1971), que também dividiu os seres vivos em cinco reinos:

- I - Reino Monera
- II - Reino Protista
- III - Reino Plantae
- IV - Reino Fungi
- V - Reino Animalia

Levando-se em conta as novas relações evolucionárias, WHITTAKER (1989), apresentou os novos conceitos sobre os Reinos dos organismos vivos, que podem ser classificados de maneira diferente dos dois reinos até aqui existentes (animal e vegetal).

Na taxonomia, tem que ser levado em conta que os organismos não são representados por “unidades estáticas”, mas sim, que cada espécie é um agrupamento de variedades, raças fisiológicas ou linhagens constantemente em evolução.

Com aproximadamente 70.000 espécies (CARLILE & WATKINSON, 1994), fazem parte dos Mycobionta os fungos filamentosos, os cogumelos e as leveduras, apresentando núcleos (eucariontes), mas não plastídeos (heterotróficos). Estes produzem esporos e corpos de frutificação, tendo como substâncias de reserva o glicogênio e lipídeos. A parede celular é



rígida e constituída de quitina, celulose, ou ambas, sendo o corpo vegetativo formado de filamentos ramificados, com crescimento apical denominados hifas.

Ao discorrer sobre a classificação e nomenclatura dos fungos, Cooper (cf. LENNETTE *et al.*, 1987), salienta que esses últimos diferenciam-se das bactérias pelo fato de apresentarem paredes celulares formadas lentamente e compostas por polímeros de polissacarídeos, como por exemplo: a glucana, a manana, a celulose e a quitina, não existindo nos fungos os ácidos teicóico e murâmico, comuns na parede celular das bactérias.

As leveduras como os bolores são fungos, mas deles se diferenciam por se apresentarem usual e predominantemente sob a forma unicelular. As leveduras não são uma entidade taxonômica natural, embora exibam uniformidade morfológica. Também são diferenciadas, menos de acordo com elementos da morfologia e mais de conformidade com características fisiológicas. Algumas não formam esporos e são consideradas fungos imperfeitos.

Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente que os bolores. Diferenciando-se também das algas por não efetuarem fotossíntese e igualmente, não são protozoários porque possuem uma parede celular rígida. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas.

JOLY (1954) refere-se à Pasteur como o introdutor dos estudos que forneceram os melhores conhecimentos sobre as leveduras, trabalhos publicados em *Études sur levin* (1866) e *Études sur la bière* (1876). Depois de Pasteur, houve um período de febril atividade, progredindo rapidamente, a taxonomia e a sistemática das leveduras. Hansen, em 1896, foi quem

começou a dar um cunho marcante à Sistemática das leveduras, baseando-se em trabalhos realizados por mais de 30 anos. Büchner, mais tarde, prestou uma valiosa colaboração, ao descrever a zimase alcoólica e em 1909, Guilliermond publicou o primeiro tratado inteiramente dedicado às leveduras, que pela primeira vez incluía chaves de identificação desses microrganismos, esboçando a linha filogenética das leveduras, fundamentando suas opiniões no estudo morfológico que realizou das mesmas. Cita ainda que Stelling-Dekker dividiu-as em dois grupos (famílias), baseando-se na formação ou não de micélios e, mais tarde, Guilliermond acrescentou outra divisão, baseando-se nas suas linhas de descendência. Continua o autor que estudos posteriores realizados por Winge & Laustsen e ainda por Guilliermond em 1940, acrescentaram novas relações entre os seres desses grupos, especialmente entre as leveduras e os basidiomicetos, relacionando-se finalmente com os fungos.

Foi por volta de 1938, também que Jelinek (cf. JOLY, 1954) demonstrou serem as reações sorológicas um recurso importante para a classificação das leveduras, justificando que os microrganismos apresentam grande variabilidade e inconstância de caracteres celulares, fatores de erros na sistemática morfológica.

No que concerne à citologia das leveduras, LENNETE *et al.* (1987) ressaltaram que a composição química de suas paredes celulares têm sido muito estudada, demonstrando que nas bactérias e em certos fungos, as diferenças nessa composição, especialmente de aminoácidos e de carboidratos, constituem-se em importante auxílio para a taxonomia desses organismos. A parede celular da maior parte das leveduras é constituída de manana, quitina e glucana, sendo que todas as espécies do gênero *Candida*,

apresentam esses três componentes. Outros constituintes importantes das paredes celulares das leveduras são as proteínas, presentes em todas as espécies, variando os tipos e as quantidades.

Lodder e Kreger van Rij (1952) e Kreger van Rij (1969), classificaram o gênero *Candida* Berkout (1923), como pertencente a família *Cryptococcaceae*, subfamília *Cryptococcoideae*. Esses autores registraram 30 espécies e 6 variedades, enquanto que Van Uden e Buckley (1970) descreveram 81 espécies (cf. ESTEVES *et al.*, 1977). Em 1954, JOLY baseou seu trabalho de tese, nos preceitos de Kreger van Rij e Lodder, que em seus livros sobre as leveduras, de 1952, fundamentaram a identificação sistemática das leveduras em função de seus caracteres morfológicos, fisiológicos e culturais.

Segundo os aspectos de sua nomenclatura, taxonomia, ecologia, método de estudo (isolamento, identificação e preservação das culturas) e a fisiologia (nutrição, citologia e antibiose), SKINNER & FLETCHER (1960), realizaram uma revisão geral sobre as leveduras do gênero *Candida*. Salientaram que Roger, em 1953, propôs que o nome *Candida* fosse conservado (nomem conservandum), muito embora o nome de *Syringospora* tivesse a prioridade, sendo utilizado mundialmente pelos pesquisadores. ALMEIDA (1991), relatou que o gênero *Candida* apresentava até 1923, 196 espécies, sendo a espécie *Candida albicans* uma das mais estudadas, devido à sua patogenicidade.

Trabalhos realizados por CORREA (1984) relatam que Scherwitz *et al.*, (1978), descreveram os componentes intracelulares das leveduras do gênero *Candida* como idênticos aos encontrados em outras. Suas estruturas são unicelulares com um único nucléolo, apresentando envelope nuclear

constituído por um par de membranas. Os vacúolos existentes são delimitados por uma única membrana. O retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e ribossomos são organelas constantes no citoplasma.

BARTNICKI-GARCIA (1968), descrevem a parede celular como uma versátil "residência" para a levedura pois ela se expande continuamente através de seu crescimento, sendo extensivamente remodelada durante o seu desenvolvimento. Através da diversificação na construção de sua parede celular, os fungos podem adquirir uma grande variabilidade nas suas características morfológicas, conseguindo dessa forma realizar várias funções, como por exemplo o crescimento vegetativo, a colonização do substrato, a penetração no hospedeiro, etc. Desse modo, o desenvolvimento morfológico dos fungos, depende da morfogênese da parede celular o que está fortemente relacionado com a taxonomia.

Estudos conduzidos por TSUCHIYA *et al.* (1955) através da análise antigênica por aglutinação em lâmina, de sete espécies do gênero *Candida*, onde analisaram a termoestabilidade e termolabilidade desses antígenos, demonstraram a ocorrência de nove classes de antígenos termoestáveis e três classes de antígenos termolábeis, entre as espécies estudadas. Duas espécies foram diferenciadas pelos antígenos termoestáveis, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

Segundo KEMP & SOLOTOROVSKY (1963), foi Benham quem primeiro sugeriu a existência de um grupo de antígenos e a dificuldade em se diagnosticar esses componentes por aglutinação, devida a reatividade cruzada entre as diferentes espécies. Ela demonstrou a inespecificidade, devido às reações cruzadas, para *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* e *Hansenula*. Citam também, que Hasenclever e Mitchell (1961<sup>a</sup>)

demonstraram a existência de dois grupos antigênicos em *C. albicans* um tendo estrutura antigênica idêntica à *Candida tropicalis*, denominado sorotipo A, e outro idêntico à *Candida stellatoidea*, o sorotipo B, sugerindo então existir uma relação antigênica entre essas espécies. Nessa linha de investigação TRAN VAN KY *et al.* (1963) detectaram 7 antígenos diferentes em sobrenadantes de cultura de *C. albicans* através de imunodifusão. Segundo JEGANATHAN & CHAN (1992), estes antígenos são provavelmente derivados da parede celular da *C. albicans*. GORDON *et al.* (1967) citam que Kaplan & Kaufman (1961) e Gordon (1962) estabeleceram que é possível diferenciar *C. tropicalis* de *C. albicans* e de *C. stellatoidea*, através do uso de anticorpos fluorescentes, provavelmente pelo fato da parede celular de *C. albicans* ter pelo menos um polissacarídeo antigênico a mais que a *C. tropicalis*, fato esse posteriormente relatado por Muller & Bürger's, em 1965.

Estudos realizados por PONTON *et al.* (1993), demonstraram que antígenos das duas fases morfológicas de *C. albicans*, o blastosporo e o tubo germinativo, são sempre observáveis nos tecidos infectados, sendo utilizados para uma grande variedade de testes sorológicos, com o intuito de atender às necessidades sorológicas.

Nas últimas décadas, várias técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a taxonomia dos fungos e leveduras. Dentre elas, destacam-se os trabalhos de SPENCER & GORIN (1969) que realizaram um estudo sobre a sistemática das leveduras do gênero *Candida* Berkout, através da análise da parede celular de leveduras por ressonância magnética. Métodos de separação de cromossomos têm sido também utilizados para a identificação e diferenciação de linhagens de

leveduras. CARLE & OLSON (1984, 1985) utilizaram o método “orthogonal-field-alternation gel electrophoresis” (OFAGE) afim de estabelecerem um padrão de bandas para *Saccharomyces cerevisiae*.

SCHERER & STEVENS (1987) propuseram um método de análise do DNA de diferentes espécies de *Candida*, com ênfase nos estudos epidemiológicos e taxonômicos. Esses autores desenvolveram toda a técnica de extração de DNA, digestão do genoma por endonucleases de restrição (no caso, a *Eco RI*) e eletroforese, resultando em vários trechos de DNA digerido, o que produziu um “*fingerprint*” de padrões eletroforéticos das leveduras. Trabalhando com clonagem do gene da actina, de diferentes espécies de *Candida* de importância médica, MASON *et al.* (1987), observaram grande polimorfismo genético entre as espécies. Os autores demonstraram assim, que a técnica por eles descrita – denominada “*Southern Blot*” – poderia ser empregada, como ferramenta molecular, na diferenciação desses microrganismos, uma vez que fornecia grande polimorfismo de bandas, em nível interespecífico.

BARNS *et al.* (1991), enfatizaram a pesquisa da filogenia de espécies patogênicas de *Candida* e de outros gêneros de leveduras, através da análise dos RNA ribossômicos, sabidamente moléculas que sofrem poucas alterações estruturais, durante o processo evolutivo. Salientaram também que o método de classificação das leveduras, de acordo com sua forma sexuada, têm trazido muitas confusões para a taxonomia dos fungos, sugerindo novas propostas para evitar o emprego dessas características sexuais.

A análise das proteínas na taxonomia dos fungos, tem sido muito utilizada tendo em vista que cada enzima é codificada por uma seqüência de aminoácidos controlados por um gene (SHECHTER, 1973; HALL, 1973;

VANCANNEYT, 1991). Ao se comparar a estrutura de uma enzima, está-se comparando indiretamente, a própria estrutura do material genético que está sendo expresso, avaliando-se dessa forma as relações fenética-taxonômicas dos grupos. Dentre as técnicas utilizadas, destaca-se a eletroforese em suporte de gel.

A eletroforese de proteínas é uma técnica sensível que, normalmente, fornece dados úteis sobre a similaridade ou não de isolados, dentro de espécies, subespécies ou biotipos (KERSTERS & DE LEY, 1980; JACKMAN, 1985; KERSTERS, 1985).

A utilização da eletroforese de algumas proteínas com qualidades catalíticas específicas denominadas isoenzimas (ou isozimas), tem se mostrado também um método alternativo para o estudo da estrutura genética de populações de eucariontes (LEWONTIN, 1974; NEI, 1975; AYALA, 1976; NEVO *et al.*, 1980; RATTAZZI *et al.*, 1983, SELANDER & WHITTAM, 1983) e tem sido empregada na taxonomia e pesquisa epidemiológica de leveduras (YAMAZAKY & KOMAGATA, 1981; LEHMANN *et al.*, 1989b; CAUGANT & SANDVEN, 1993). Esta técnica permite a separação de macromoléculas eletricamente carregadas em uma solução, quando a esta é aplicada uma diferença de potencial.

Diversos sistemas têm sido desenvolvidos para facilitar estudos de caracterização de espécies de vários microrganismos, estando entre elas a técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970 e MATSUOKA *et al.*, 1988), sendo esta técnica freqüentemente usada em laboratórios de microbiologia.

Os estudos pioneiros de HUISINGH & DURBIN (1965,1967), utilizando a eletroforese para identificação e caracterização de espécies de *Agrobacterium*, representam o marco inicial da utilização de eletroforese em

fitobacteriologia. Utilizando PAGE descontínua, esses autores encontraram um padrão protéico característico para cada espécie.

HALL *et al.* (1969) desenvolveram estudos taxonômicos empregando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, para a identificação de proteínas de fungos do gênero *Phytophthora*, conseguindo encontrar variações entre as bandas obtidas de espécies diferentes.

Pela utilização de SDS-PAGE para proteínas solúveis e uma avaliação visual dos perfis, combinados com outras técnicas, CARLSON & VIDAVER (1982) propuseram alterações na taxonomia do gênero *Corynebacterium*, o que levou, posteriormente, à criação do gênero *Clavibacter* (DAVIS *et al.*, 1984).

VAN VURREN & VAN DER MEER (1987), analisaram através de SDS-PAGE 27 linhagens de *Saccharomyces* utilizadas comercialmente para a produção de vinho e duas linhagens usadas na fermentação de cerveja. O padrão de bandas protéicas foi usado com um “fingerprinting” das linhagens. Diferentes grupos genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* foram distinguidos. O padrão de proteínas das linhagens dentro de cada grupo apresentou uma alta correlação confirmando que *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum* e *Saccharomyces carlsbergensis* correspondem à mesma espécie que de *Saccharomyces cerevisiae*. HOLMES *et al.* (1990), utilizaram o método de proteínas totais (SDS-PAGE) para a identificação de 32 bactérias pertencentes ao grupo das *Achromobacter* de interesse clínico e o método se mostrou satisfatório na diferenciação entre as linhagens quando comparadas ao organismo padrão.

BERIAM *et al.* (1991), utilizando SDS-PAGE, observaram apenas pequenas diferenças nos padrões protéicos das espécies *Agrobacterium*



*tumefaciens*, *A. radiobacter* e *A. rhizogenes*. Entretanto, verificaram diferenças nos perfis de proteínas, em função da origem dos isolados de *A. tumefaciens*.

TAVARES *et al.* (1992), constataram que o método de eletroforese de proteínas apresenta satisfatória diferenciação entre *Saccharomyces cerevisiae*, sendo um método rápido e fácil na detecção de contaminantes da fermentação.

O desenvolvimento e padronização de todas as etapas das eletroforeses de proteínas totais em géis de poliacrilamida, visando o incremento da resolução, sensibilidade, reprodutibilidade e redução de custos dessa técnica, tem sido observado por vários autores (AMES, 1974; BRUNEAU & GUINET, 1989; GOMES, 1995; ROCHELLE, 1996; ROSA, 1997; HÖFLING *et al.*, 1997).

ROCHELLE (1996) e HÖFLING *et al.*, 1998, 1999, demonstraram que a variação na composição dos nutrientes de alguns meios de cultura, influenciam na obtenção de proteínas intracelulares de células leveduriformes, com consequência direta na obtenção dos perfis eletroforéticos em SDS-PAGE. A análise numérica de linhagens de *Candida sp.* ROSA, (1997) e HÖFLING *et al.* (1997) mostrou também que diferentes métodos de extração de proteínas produzem perfis eletroforéticos sujeitos a perda de bandas com consequente variabilidade artificial.

Variações da técnica original de eletroforese de proteínas totais, permitiram o estudo das variabilidades intra e inter-específicas de isolados de leveduras do gênero *Candida*. Assim, SHEN *et al.* (1988), introduziram a técnica de análise dos perfis de proteínas radiomarcadas com [<sup>35</sup>S] metionina, na identificação diferencial de oito espécies de *Candida* (C.

*albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr*, *C. lipolytica* e *C. lusitaniae*), duas espécies de *Torulopsis* (*T. glabrata* e *T. candida*), uma espécie de *Trichosporon* (*T. beigelli*) e uma espécie de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), obtendo resultados que possibilitaram a caracterização dos gêneros e das espécies desses microrganismos. Trabalhando com amostras de leveduras isoladas da cavidade oral, MAIDEN & TANNER (1991), utilizaram-se da eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida da coloração pela prata, para a identificação desses microrganismos, visando também a sua aplicação no entendimento da biodiversidade do meio intrabucal.

A utilização da eletroforese de proteínas totais, também teve grande êxito na diferenciação e caracterização de diversos gêneros e espécies de leveduras de importância médica e industrial (VANCANNEYT *et al.*, 1991). Esses autores ressaltaram a importância e necessidade da inclusão de linhagens-tipo ("type-strains") em experimentos dessa natureza, com a finalidade de caracterizar os grupos correspondentes e correlacionados, no momento da construção de fenogramas de similaridade. Em 1992, esse mesmo grupo de pesquisadores (VANCANNEYT *et al.*, 1992) publicou outro trabalho demonstrando a aplicação da eletroforese de proteínas intracelulares totais, na identificação e classificação de leveduras, submetendo os géis (SDS-PAGE), com seus respectivos "slots", à densitometria de varredura, para posterior obtenção de matrizes de correlação e confecção de fenogramas protéicos.

Em relação ao emprego da taxonomia numérica na sistemática microbiana, MACDONELL & COLWELL (1985), citam que foi na virada do século, que métodos quantitativos começaram a ser aplicados à

taxonomia, tornando-se porém popular com o surgimento do computador, contribuindo assim para a redução do tempo da análise e da possibilidade de ocorrência de erros nos cálculos, além de permitir a análise de um grande número de amostras simultaneamente.

A taxonomia numérica baseada em similaridades fenéticas teve suas regras fundamentais publicadas por SNEATH & SOKAL, em 1973 considerando-se que: a) deve-se comparar a maior quantidade possível de caracteres em testes com grande número de amostras; b) toda característica deve ser considerada como tendo igual importância; c) a similaridade global é considerada como sendo função da soma das similaridades individuais.

Dentre os diversos tipos de análise numérica, a análise de “clusters” (grupos) formados a partir das combinações entre as linhagens, através de coeficientes de similaridade, tem sido empregada com resultados satisfatórios em estudos de Sistemática de bactérias (TANNER, 1986; COSTAS *et al.*, 1987), fungos filamentosos (JONES & NOBLE, 1982) e leveduras (SHECHTER *et al.*, 1972; VANCANNEYT *et al.*, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1992; GOMES, 1995; ROCHELLE, 1996; BORIOLLO, 2000; ROSA, 2000).

O mérito fundamental da análise taxonômico-numérica a partir de dados eletroforéticos, segundo SHECHTER (1973), deve-se à sua capacidade dinâmica de incorporar novos caracteres bioquímicos e “taxa” adicionais, em perfeita concordância com as classificações existentes.

GOMES (1995), realizando um estudo sobre métodos de caracterização de leveduras, relata que a técnica de SDS-PAGE e a técnica de análise genética baseada em marcadores RAPD (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso) são as que fornecem resultados mais confiáveis,

principalmente na avaliação de linhagens com pouca diversidade, complementando a necessidade de utilização de mais de um método, pois as limitações de um podem ser compensadas pelo outro.

Com base na literatura descrita, uma contribuição aos estudos de identificação e caracterização de leveduras do gênero *Candida*, através da análise numérica do perfil eletroforético de proteínas intracelulares de isolados de *C. albicans* da cavidade bucal e outros sítios anatômicos de humanos, foi nosso objetivo precípua.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Procedência das Amostras**

No presente trabalho, foram utilizadas leveduras do gênero *Candida*, espécie *C. albicans*, isoladas de diversos sítios anatômicos de humanos (jovens e adultos), provenientes de diversas procedências, parte pertencente à micoteca da área de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral da FOP-UNICAMP, e demais, gentilmente cedidas pela Universidade Estadual Paulista, UNESP/Botucatu e pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ- Seção de Micologia Médica – São Paulo e pelo laboratório de Análises Clínicas Prevlab/Piracicaba. (Tabela I)

**Tabela 1. Relação das amostras isoladas de diferentes sítios anatómicos utilizados em nossos experimentos**

Espécie	Origem	Sítio anatómico	Código
<i>C.albicans</i>	Lab.Prevalab	Urina	P.1
<i>C.albicans</i>	Unesp - Botucatu	Sec. orofaringe	IB. 2
<i>C.albicans</i>	Unesp - Botucatu	Escarro	IB. 3
<i>C.albicans</i>	Unesp - Botucatu	Sec.pulmonar	IB. 4
<i>C.albicans</i>	Unesp - Botucatu	Sonda	IB. 5
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Boca (AIDS)	AL. 1.2
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Boca (AIDS)	AL. 2.1 - 2.2
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Boca (AIDS)	AL. 3.1 - 3.2
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Urina	AL. 4
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Urina	AL. 5
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Urina	AL. 6
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Urina	AL. 7
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Lavado brônquico	AL. 8.1 - 8.2
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Hemocultura	AL. 9.1 - 9.2
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. abdominal	AL. 10
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Dreno	AL. 11
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. orofaringe	AL. 12
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. traqueal	AL. 13.1-13.2 -13.3
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. Traqueal	AL. 14
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 15
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 16
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. Vaginal	AL. 17
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 18
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 19
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 20
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 21
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 22
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 23
<i>C.albicans</i>	Inst. Adolfo Lutz	Sec. vaginal	AL. 24
<i>C.albicans</i>	Unesp - Lab.Clin.	Urina	LC. 01
<i>C.albicans</i>	Unesp - Lab.Clin.	Urina	LC. 02
<i>C.albicans</i>	Unesp - Lab.Clin.	Hemocultura	LC. 03
<i>C.albicans</i>	Unesp - Lab.Clin.	Secreção traqueal	LC. 04
<i>C.albicans</i>	F.O.S.J.C	Cav.Oral	F.72
<i>C.albicans</i>	F.O.S.J.C	Cav.Oral	97*
<i>C.albicans</i>	F.O.S.J.C	Cav.Oral	E37
<i>C.albicans</i>			CBS-562(type-strain)
<i>C.albicans</i>	Escolas	Saliva	Classe A - 19
<i>C.albicans</i>	Escolas	Saliva	Classe A - 116
<i>C.albicans</i>	Escolas	Saliva	Classe B - 44
<i>C.albicans</i>	Escolas	Saliva	Classe C - 46
<i>C.albicans</i>	Escolas	Saliva	Classe C - 75
<i>C.albicans</i>	Escolas	Saliva	Classe D - 47
<i>C.albicans</i>	Escolas	Saliva	Classe D - 68
<i>C.albicans</i>	Escolas	Saliva	Classe E - 44

## **2. Manutenção das Amostras**

As amostras foram mantidas durante toda a realização do estudo, em duas coleções:

A) Na primeira, as amostras foram inoculadas em meio completo para levedura (M.C.L.), de acordo com o estabelecido por NEDER (1992).

B) Na outra coleção, as amostras foram mantidas em tubos de ensaio (13x100mm) com tampão de algodão hidrófilo contendo meio completo de levedura (M.C.L.), e recobertas com óleo mineral estéril, à temperatura ambiente. As cepas assim conservadas, eram substituídas a cada 6 meses. Periodicamente, eram feitos, nos dois casos, o reconhecimento da morfologia celular e colonial (aspectos macro e microscópicos) como controle da variabilidade celular e de contaminantes.

## **3. Padronização da extração das proteínas de componentes intracelulares**

As amostras de *C. albicans* isoladas e identificadas bioquimicamente, foram inoculadas em frascos com 50 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, bacto-peptona 2% e glicose 2%) (CASANOVA & CHAFFIN, 1991; ASAKURA *et al.*, 1991) e mantidos em Incubadora "Shaker" (Nova Técnica Instrumentos e Equipamentos de Laboratório Ltda) a 37°C, com velocidade rotacional de 150 rpm, por 18 horas. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3000g, por 5 minutos (Centrífuga 215 - Fanen

Ind. e Com.), de acordo com WALTERS & BLOBEL (1986). Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em água destilada gelada (WOONTNER & JAEHNING, 1990) e o procedimento de centrifugação foi repetido por três vezes, para remoção de restos de meio de cultivo e de possíveis produtos metabólicos extracelulares. Os sedimentos obtidos foram fracionados em alíquotas de aproximadamente 0,5 mL, os quais foram submetidos ao processo de extração de proteínas.

#### **4. Extração das proteínas dos componentes intracelulares pelo método da Criofratura celular em N<sub>2</sub> líquido (GOMES, 1995).**

Do conteúdo celular de cada tubo Eppendorf foram retiradas alíquotas de 200 µL, as quais foram transferidas para um *Graal* de porcelana de 200 mL de capacidade, juntamente com 500 µL de água destilada estéril, adicionado-se, a seguir, pequenos volumes de nitrogênio líquido (aproximadamente 20 mL) (-196°), onde a massa celular era então congelada. Após a completa evaporação do nitrogênio líquido, o material resultante foi submetido à trituração, por aproximadamente 3 minutos. O material foi então recolhido em um novo tubo, centrifugado a 3500 rpm por três minutos. Os sobrenadantes foram então congelados até o momento do uso.



## **5. Determinação da concentração protéica dos extratos de *Candida albicans***

Foi realizada a determinação da concentração protéica dos extratos obtidos, através do método espectrofotométrico de BRADFORD (1976), que conforme trabalhos conclusivos de EZE & DUMBROFF (1982), mostrou-se muito sensível. Para a construção da curva padrão foi utilizado solução padrão de albumina bovina nas concentrações de 200, 400, 600, 800, 1000, 1400 e 1600  $\mu\text{g/mL}$  do tampão Tris HCl pH 6,8. Aos tubos de ensaio, foram adicionados e homogeneizados 5 mL do reagente de BRADFORD (1976) e 0,1 mL da solução padrão de albumina bovina. A curva padrão foi construída a partir da leitura de densidade ótica das amostras, estimando-se a concentração de proteínas das mesmas, baseando-se na curva padrão. As concentrações de proteínas das amostras foram padronizadas em 800  $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$  (AMES, 1974).

## **6. Desnaturação das proteínas das amostras de *Candida albicans***

Aos sobrenadantes obtidos no ítem 5, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra para cada 50  $\mu\text{L}$  de extrato preconizado por ALFENAS *et al.* (1991). As misturas foram aquecidas (Banho-Maria fervente por 10 minutos) e posteriormente, centrifugadas a 12000 g x 1 minuto, mantendo-se os sobrenadantes em gelo até o momento de uso.

## **7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Os extratos intracelulares obtidos conforme os itens anteriores, foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em sistema descontínuo, de acordo com LAEMMLI (1970), utilizando-se o sistema de mini-gel (Bio-Rad) em dimensões de 8,3x10,2 cm e espaçadores de 1,5 mm.

Utilizou-se o gel empilhador ("stacking gel") a 4% e o gel separador ("running gel") a 10% em sistema de tampão Tris-glicina pH 8,9.

Foram introduzidos nos géis 25µL dos extratos com tampão de amostra nos poços superiores dos géis empilhadores e estabeleceu-se uma voltagem de 125 volts e corrente constante de 25°T, até o término da corrida eletroforética.

Após a corrida eletroforética, o gel foi então retirado da placa e corado com solução 0,025% de Azul de Coomassie G-250 por 12 horas e posteriormente lavado (descoloração) em solução descorante com ácido acético 10% e metanol 25%, em água destilada, trocados sucessivamente até a descoloração do gel.

## **8. Análise numérica dos perfis eletroforéticos das proteínas totais de *Candida albicans* obtidos por SDS-PAGE**

Para o estabelecimento do grau de similaridade entre as linhagens de *C. albicans*, utilizou-se os extratos de proteínas totais das amostras, obtidas pelo método descrito no item 4, adicionado dos extratos protéicos da linhagem-tipo representativa da espécie *C. albicans* CBS-562 (VANCANNEYT *et al.*, 1991) ao lado do padrão de massa molecular (Bio-Rad Laboratories), para avaliação da reprodutibilidade (COSTAS *et al.*, 1989a; COSTAS *et al.*, 1989b).

As condições de cultivo, técnicas de extração, determinação da concentração, desnaturação das proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no emprego da linhagem tipo CBS-562, são as mesmas descritas nos itens acima.

## **9. Processamento das imagens**

Após a descoloração dos géis, os mesmos foram secos em papel de filtro e interpostos entre duas folhas de filme para transparência, sendo a imagem capturada em um "twin-scanner" (Scan Jet 4C e adaptador para transparência HP 4C. Hewlett Packard Co.) onde suas imagens positivas foram processadas através do software Kodak Digital Science 1D™ originando os valores das massas moleculares das bandas protéicas de cada

amostra em relação à linha de migração do corante azul de bromofenol presente no tampão de amostra.

## **10. Construção das matrizes de similaridade**

Os valores das massas moleculares das bandas protéicas, obtidas em função dos valores padrões conhecidos de massa molecular, tiveram suas distâncias de migração convertidas em valores numéricos, que receberam representações 1 (um) e 0 (zero), para a presença e ausência das bandas, respectivamente, numa separação entre as mesmas. O conjunto dessas informações deram origem a quinze matrizes de dados, sendo 14 matrizes para diferentes sítios anatômicos e uma matriz final, contendo 14 amostras de diferentes sítios anatômicos. Essas matrizes de dados binários foram plotadas no sistema NTSYS-pc versão 1.70 (Applied Biostatistics, 1992), empregando-se o programa QUALITATIVE e o *coeficiente de similaridade SM* (Simple Matching Coefficient), que gerou uma matriz de similaridade entre as amostras.

## **11. Construção dos dendrogramas de similaridade**

Através do mesmo sistema computacional, essas matrizes de similaridade foram transferidas para o programa SAHN-Clustering (desempenho seqüencial e aglomeração hierárquica de grupos), e pelo método de agrupamento UPGMA (FARRIS, 1969; SNEATH & JOHNSON, 1972;

SNEATH & SOKAL, 1973), obteve-se os dendrogramas que possibilitaram as avaliações dos graus de similaridade existentes entre as amostras de *C. albicans* utilizadas neste experimento.

## RESULTADOS

### 1. Análise dos dendrogramas de similaridade

As amostras submetidas à extração de proteínas intracelulares e analisadas por SDS-PAGE, permitiram a obtenção de perfis eletroforéticos de diferentes sítios anatômicos (Figuras 15 e 16) e de seus respectivos sítios característicos das linhagens em particular, (não incluídos na tese) os quais foram analisados pelo programa NTSYS-pc versão 1.70. A utilização do *coeficiente de similaridade SM* (Simple Matching) possibilitou a construção das matrizes de similaridade (S) para as amostras dentro de um mesmo sítio ou de sítios diferentes (Tabela 2). Essas matrizes, analisadas através do método de agrupamento UPGMA, permitiram a obtenção dos dendrogramas, os quais possibilitaram as avaliações dos graus de similaridade existentes entre os isolados de *C. albicans* de diferentes sítios anatômicos (Figura 17) e também a avaliação dessas linhagens separadamente em seus respectivos sítios (Figuras 1 a 14). Esses dendrogramas também foram analisados aplicando-se aos mesmos linhas de corte, traçadas perpendicularmente em seus valores médios de similaridade, que possibilitaram a formação de "clusters" durante a análise.

## 1.2 Análise dos dendrogramas de similaridade para os isolados pertencentes aos mesmos sítios anatômicos

As linhagens de *C. albicans* foram analisadas primeiramente, separadamente dentro de seus respectivos sítios anatômicos comparando-se a amplitude dos graus de similaridade dentro dos dendrogramas (Figura 1 a 14) e, a formação de "clusters" em seus valores médios de similaridade.

As linhagens de *C. albicans* isoladas da Boca de indivíduos com H.I.V. mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 82 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de dois "clusters" durante a análise, podendo ser visualizados na abaixo:

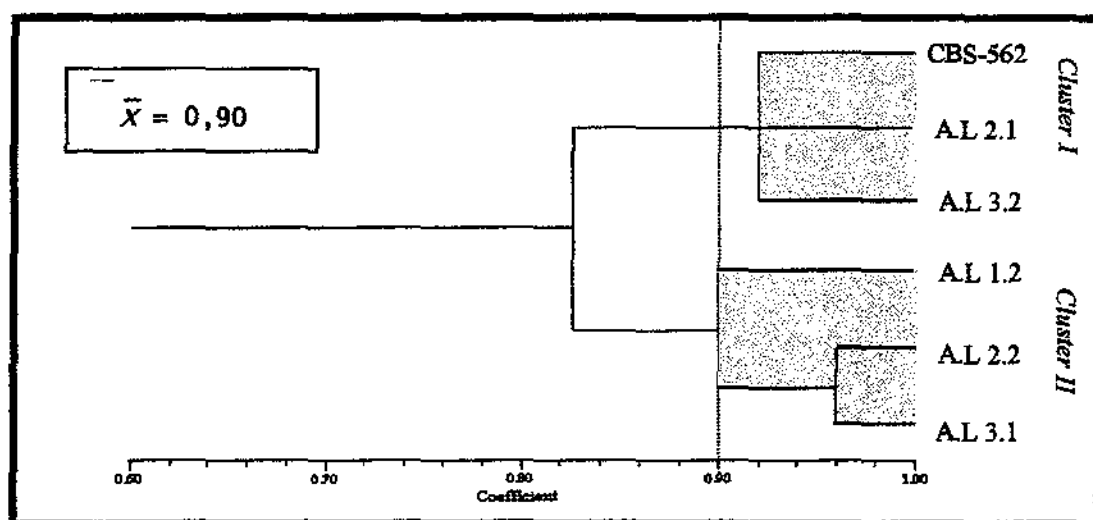
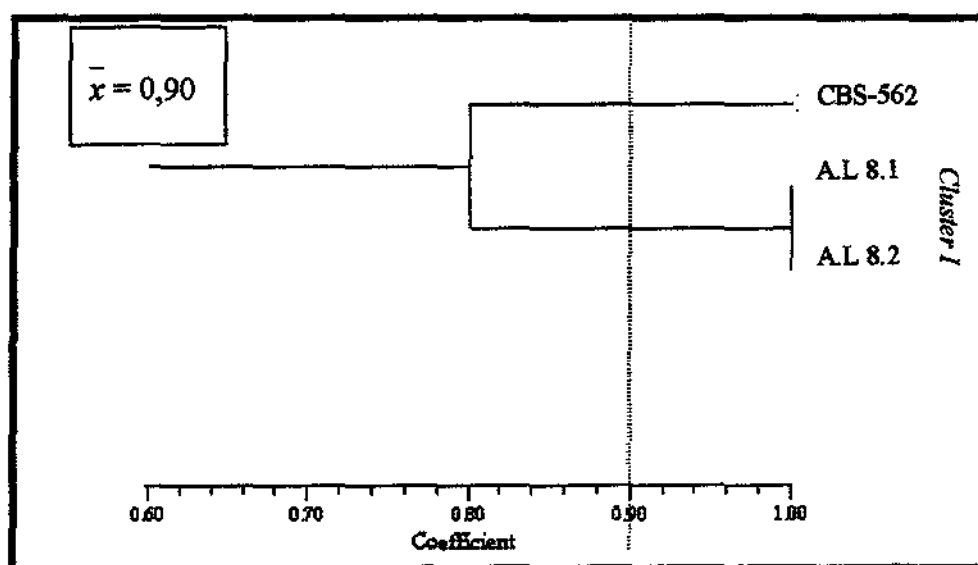


FIGURA 1: Dendrograma de similaridade para as linhagens de *C. albicans* isoladas de boca de indivíduos com H.I.V.

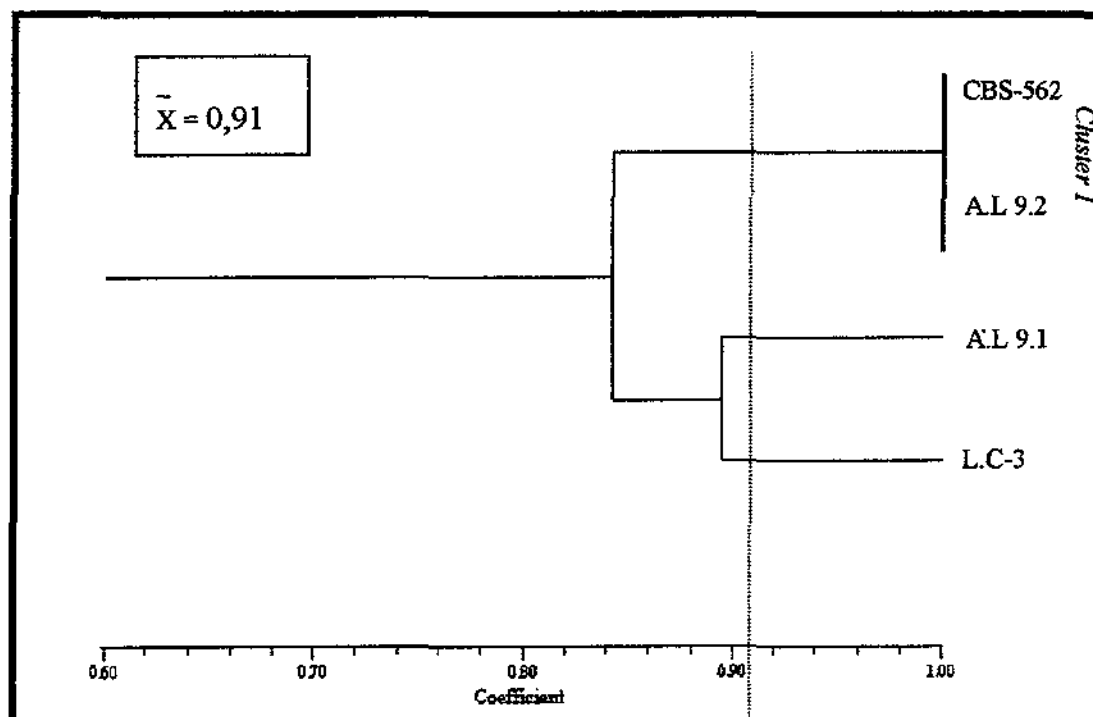
As linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Lavado Brônquico mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 80 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster", podendo ser visualizado na Figura abaixo.



**FIGURA 2:** Dendrograma de similaridade para linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Lavado Brônquico.

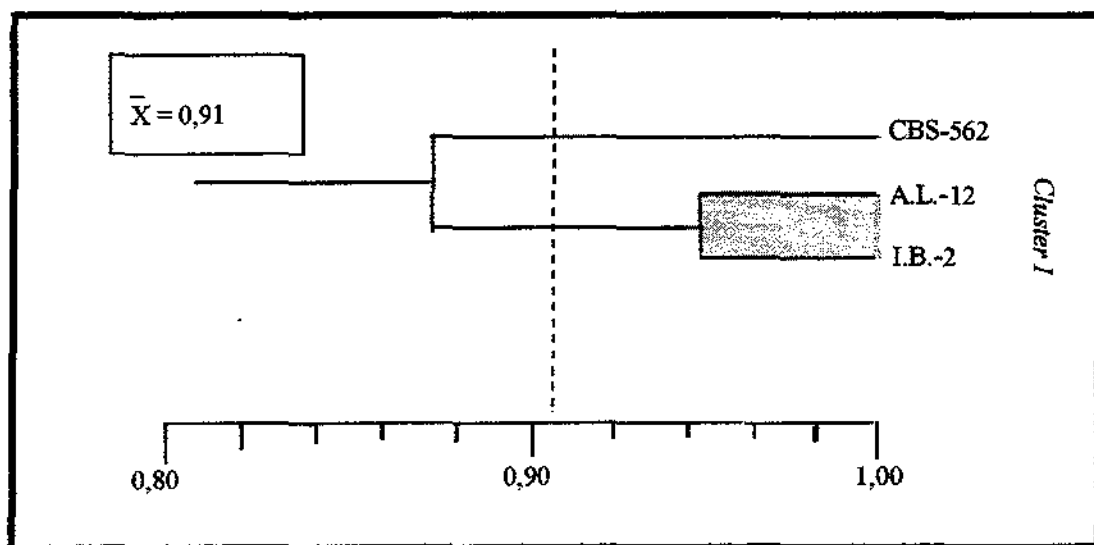


As linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Hemocultura mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 84 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster", podendo ser visualizado na Figura a baixo:



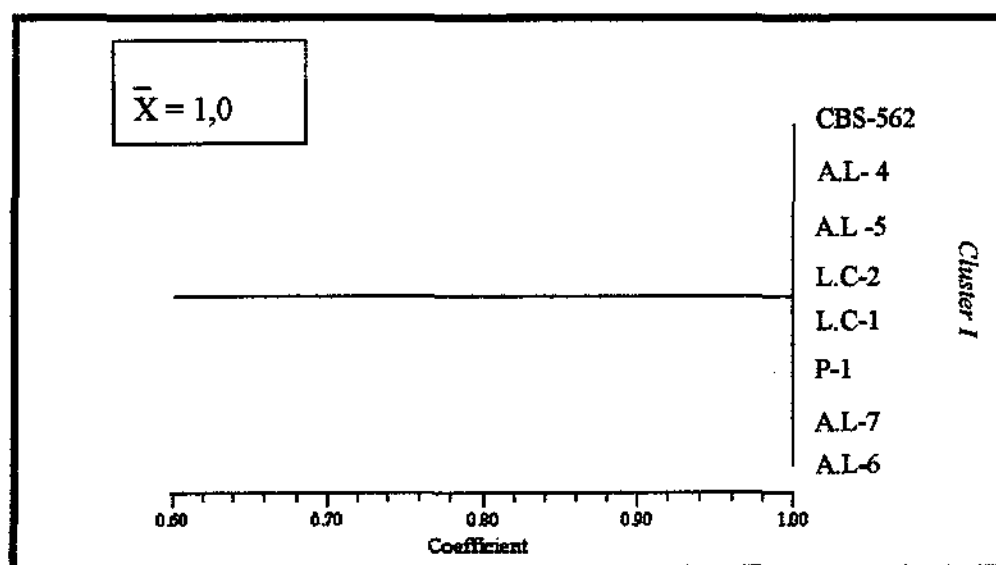
**FIGURA 3: Dendrograma de similaridade para linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Hemocultura.**

As linhagens de *C. albicans* isoladas de Secreção de Orofaringe, mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 87 a 100 (%). Os valores de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster", podendo ser visualizado na Figura abaixo:



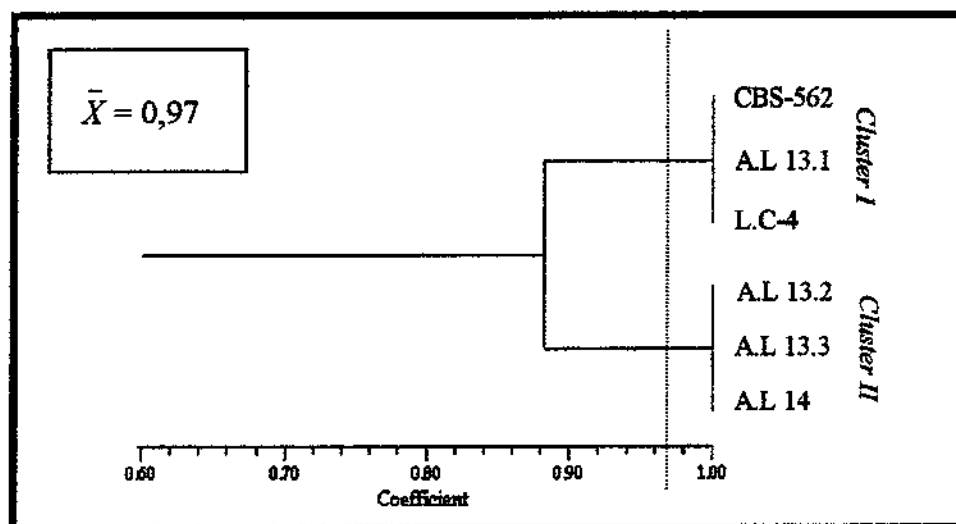
**FIGURA 4 : Dendrograma de similaridade para linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Secreção de Orofaringe.**

As linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Urina, mostraram-se associadas com 100 (%) de similaridade. Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster", podendo ser visualizado na Figura abaixo:



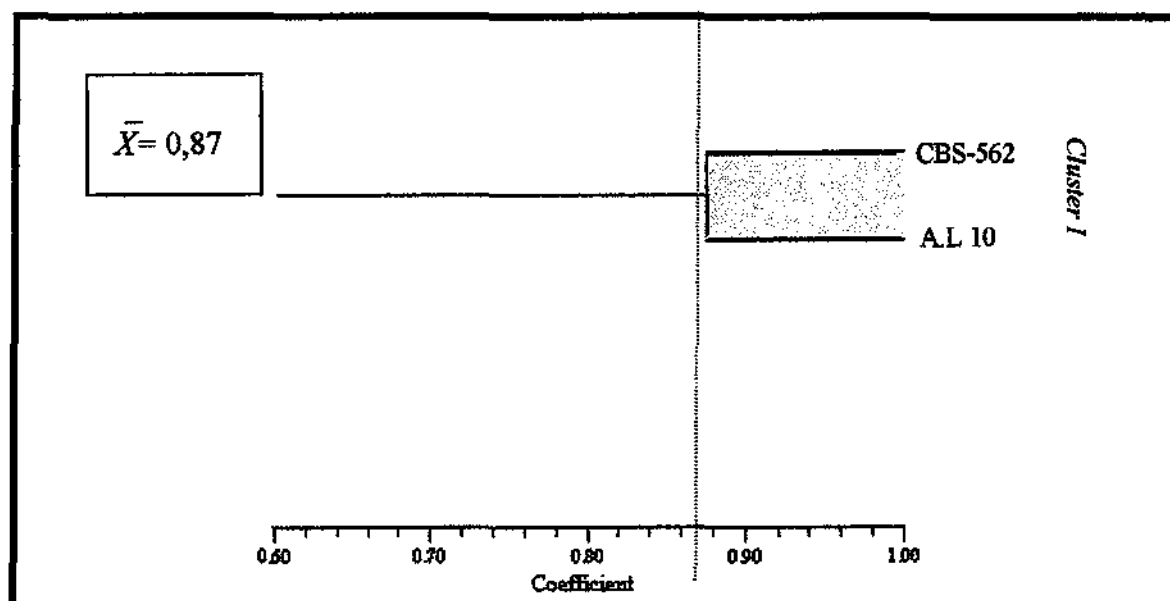
**FIGURA 5: Dendrograma de similaridade para linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Urina.**

As linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Secreção Traqueal, mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 88 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de dois "clusters", podendo ser visualizado na Figura abaixo:



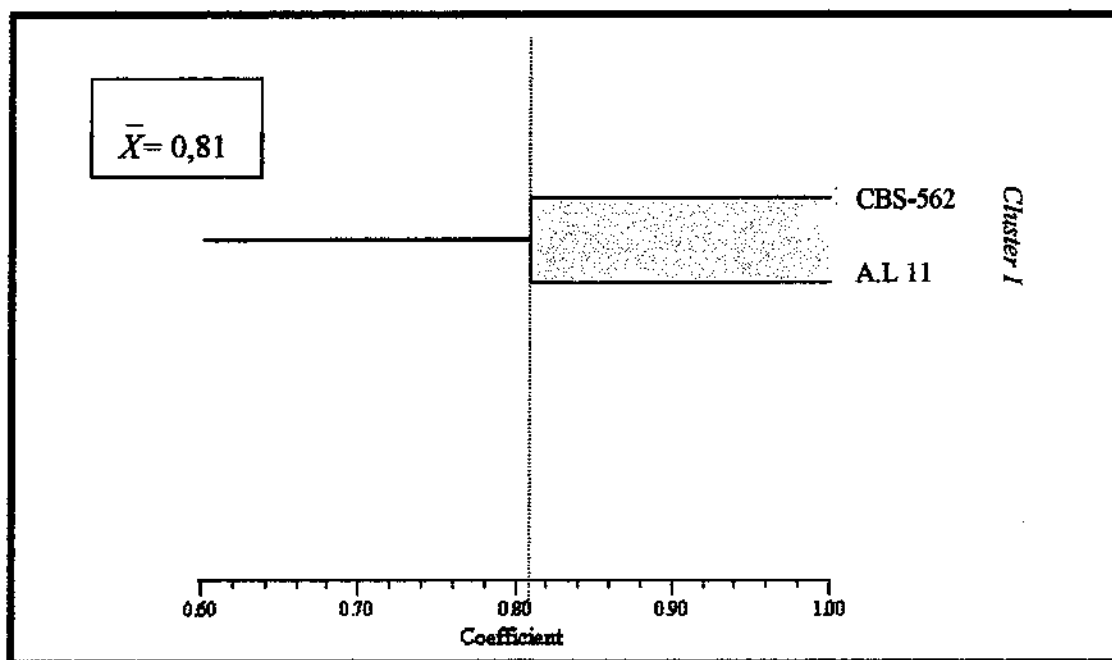
**FIGURA 6: Dendrograma de similaridade para linhagens de *C. albicans* isoladas de material de Secreção Traqueal.**

A linhagem de *C. albicans* isolada de material de Secreção Abdominal, mostrou-se associada com a linhagem-tipo CBS-562 com grau de similaridade entre 87,0 a 100,0 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster", podendo ser visualizado na Figura abaixo:



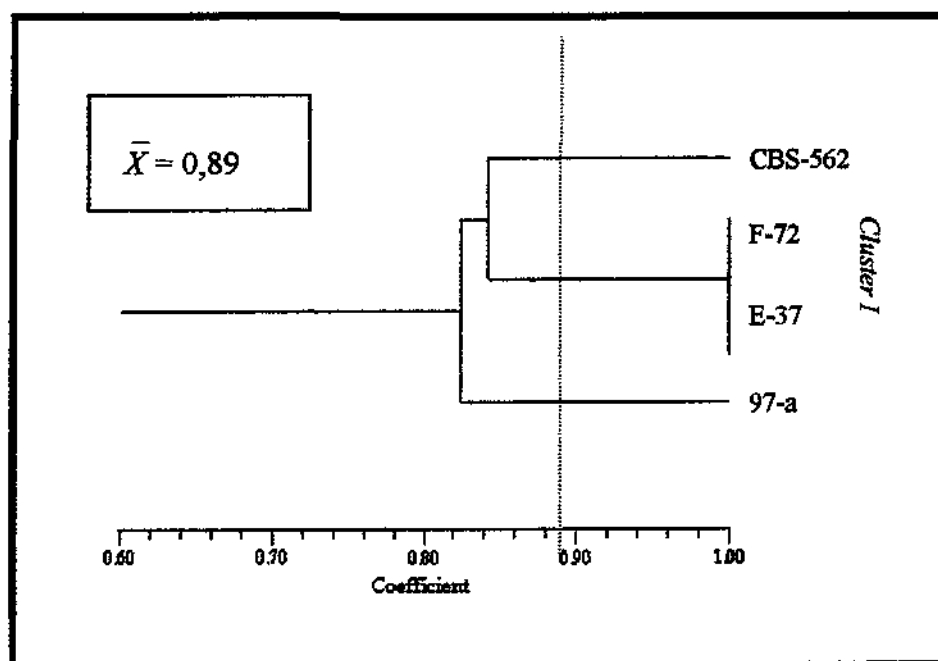
**FIGURA 7:** Dendrograma de similaridade para a linhagem de *C. albicans* isolada de Secreção Abdominal.

A linhagem de *C. albicans* isolada de material de Dreno mostrou-se associada com a linhagem-tipo CBS-562 com graus de similaridade variando entre 80 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster" durante a análise, podendo ser visualizado na Figura abaixo:



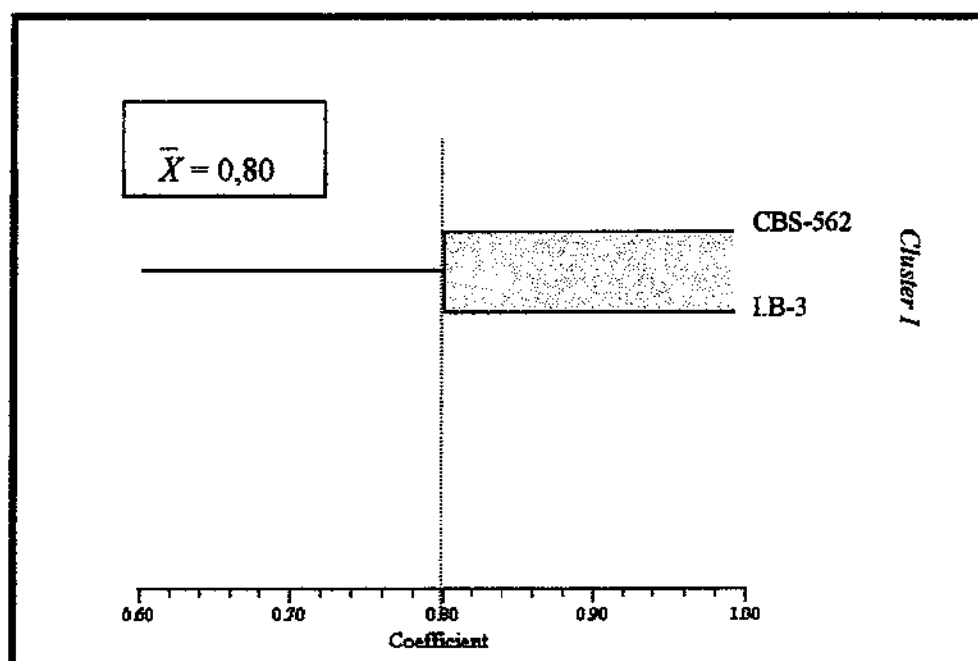
**FIGURA 8:** Dendrograma de similaridade para a linhagem de *C. albicans* isolada de material de Dreno.

As linhagens de *C. albicans* isoladas da Cavidade Bucal mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 82 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster" durante a análise, podendo ser visualizado na Figura abaixo:



**FIGURA 9:** Dendrograma de similaridade para as linhagens de *C. albicans* isoladas de Cavidade Bucal.

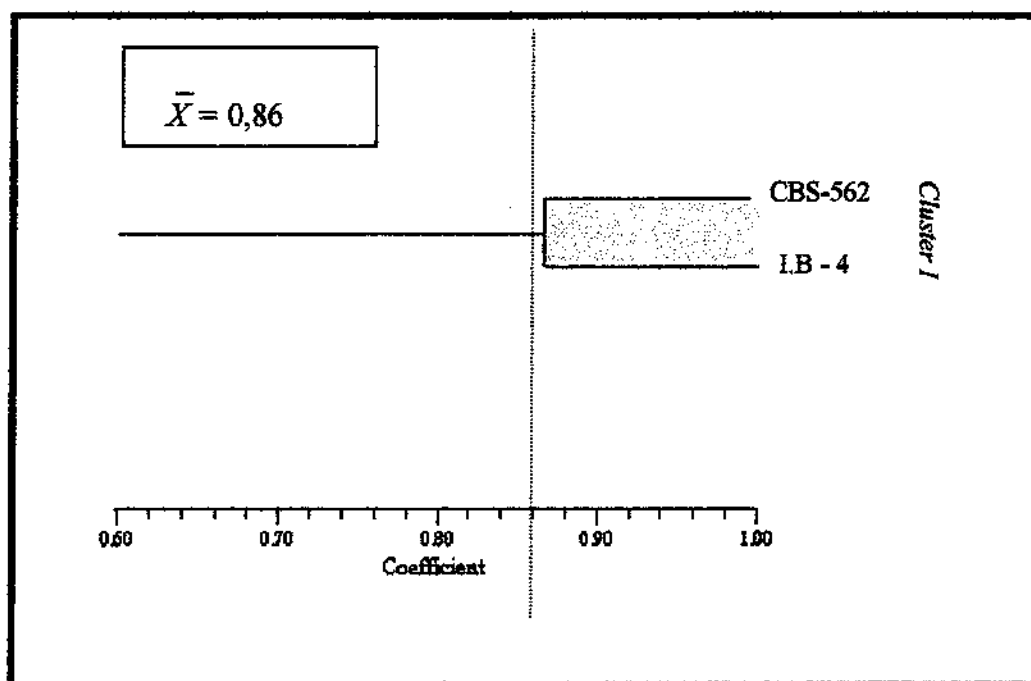
A linhagem de *C. albicans* isolada de material de Escarro mostrou-se associada com a linhagem-tipo CBS-562 com graus de similaridade variando entre 80 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster" durante a análise, podendo ser visualizado na Figura abaixo:



**FIGURA 10: Dendrograma de similaridade para as linhagem de *C. albicans* isolada de material de Escarro.**

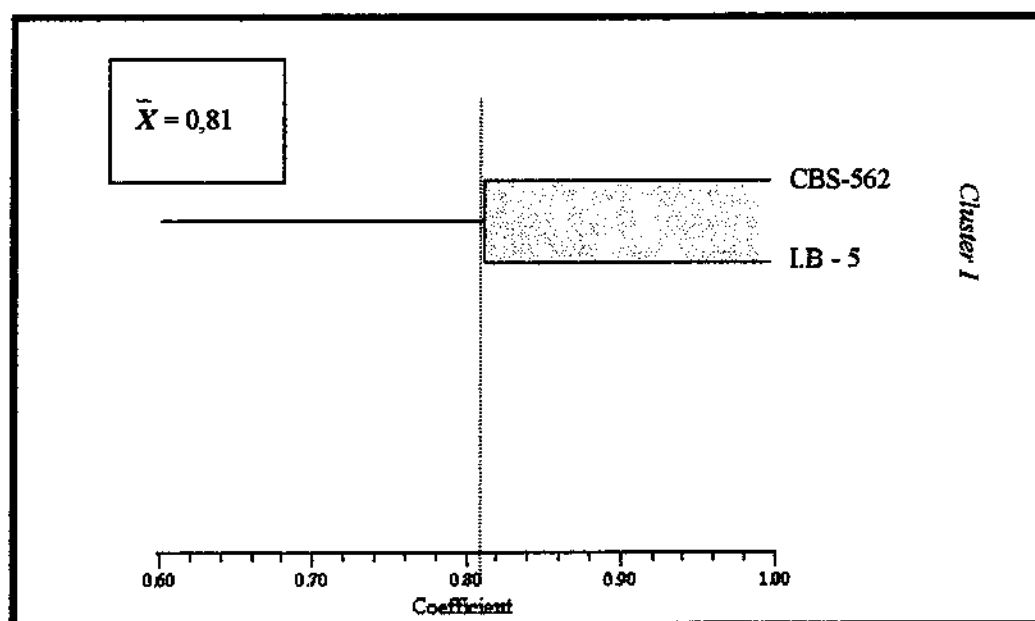


A linhagem de *C. albicans* isolada de material de Secreção Pulmonar mostrou-se associada com a linhagem-tipo com graus de similaridade variando entre 87 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster" durante a análise, podendo ser visualizado na Figura abaixo:



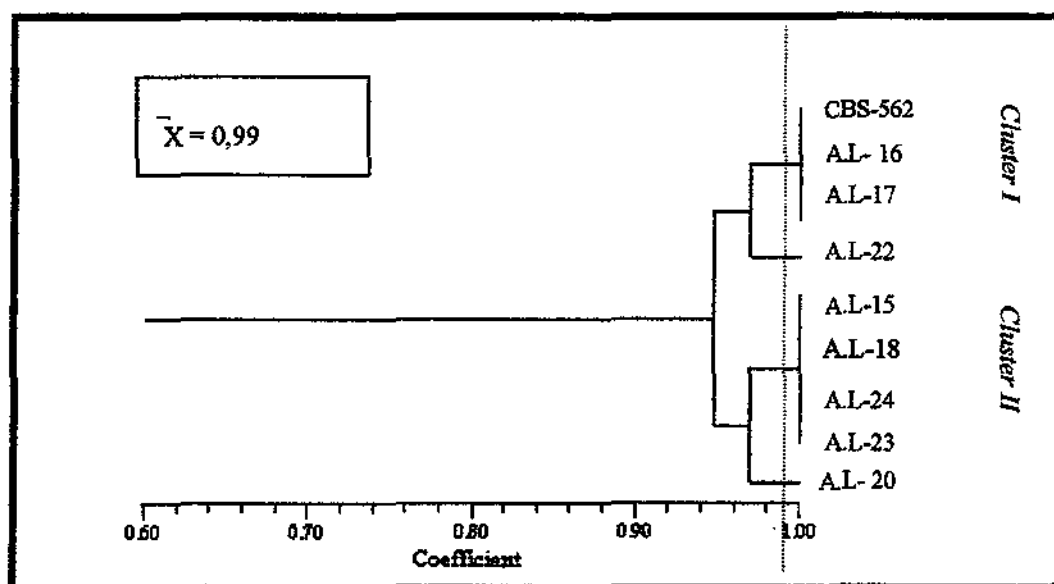
**FIGURA 11: Dendrograma de similaridade para a linhagem de *C. albicans* isolada de Secreção Pulmonar.**

A linhagem de *C. albicans* isolada de material de Sonda Vesical mostrou-se associada com a linhagem-tipo CBS-562 com graus de similaridade variando entre 81 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de um "cluster" durante a análise, podendo ser visualizados na Figura abaixo:



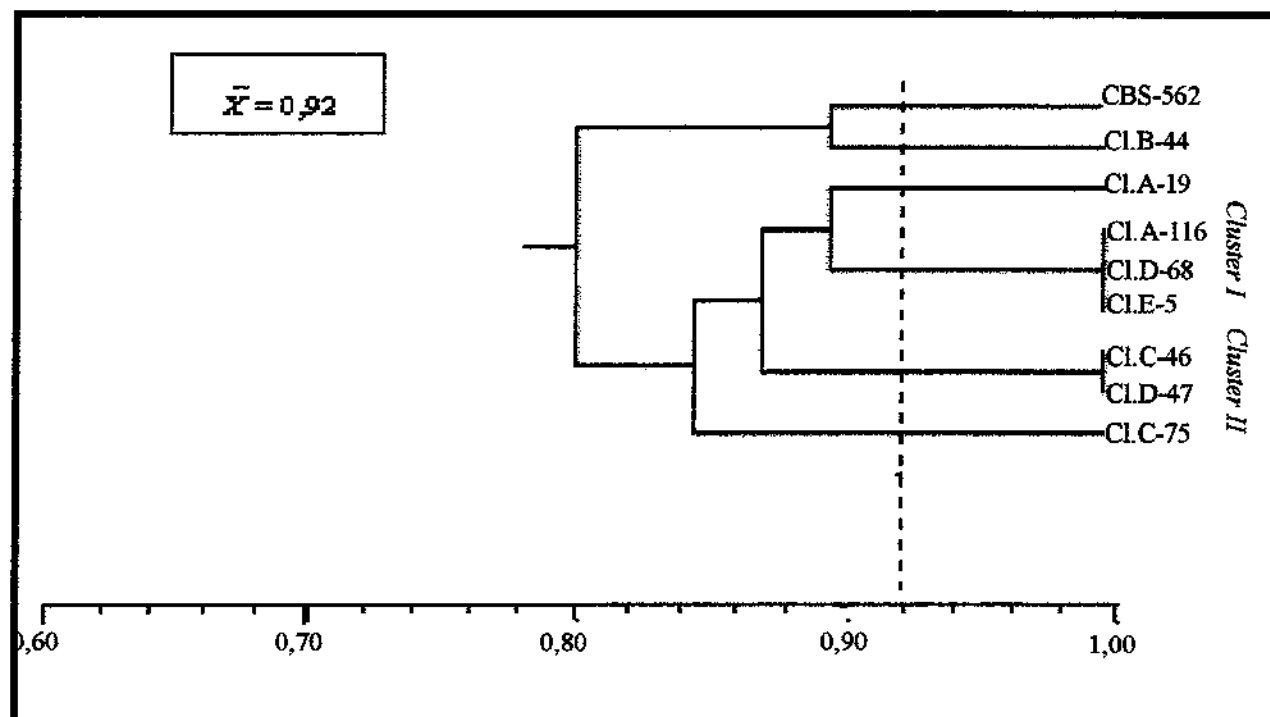
**FIGURA 12:** Dendrograma de similaridade para as linhagem de *C. albicans* isolada de material de Sonda Vesical.

As linhagens de *C. albicans* isoladas de Secreção Vaginal mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 95 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de dois "clusters" durante a análise, podendo ser visualizados na Figura abaixo:



**FIGURA 13: Dendrograma de similaridade para as linhagens de *C. albicans* isoladas de Secreção Vaginal.**

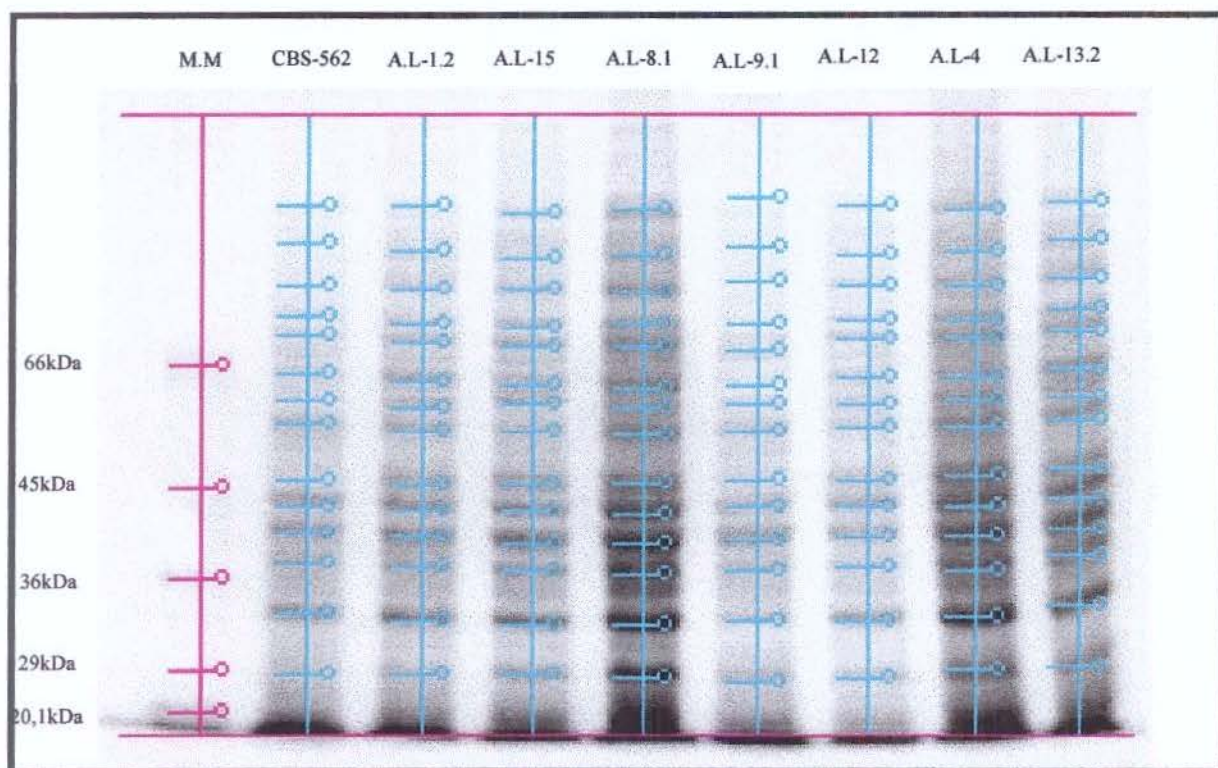
As linhagens de *C. albicans* isoladas de Saliva mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 80 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de dois "clusters" durante a análise, podendo ser visualizados na Figura abaixo:



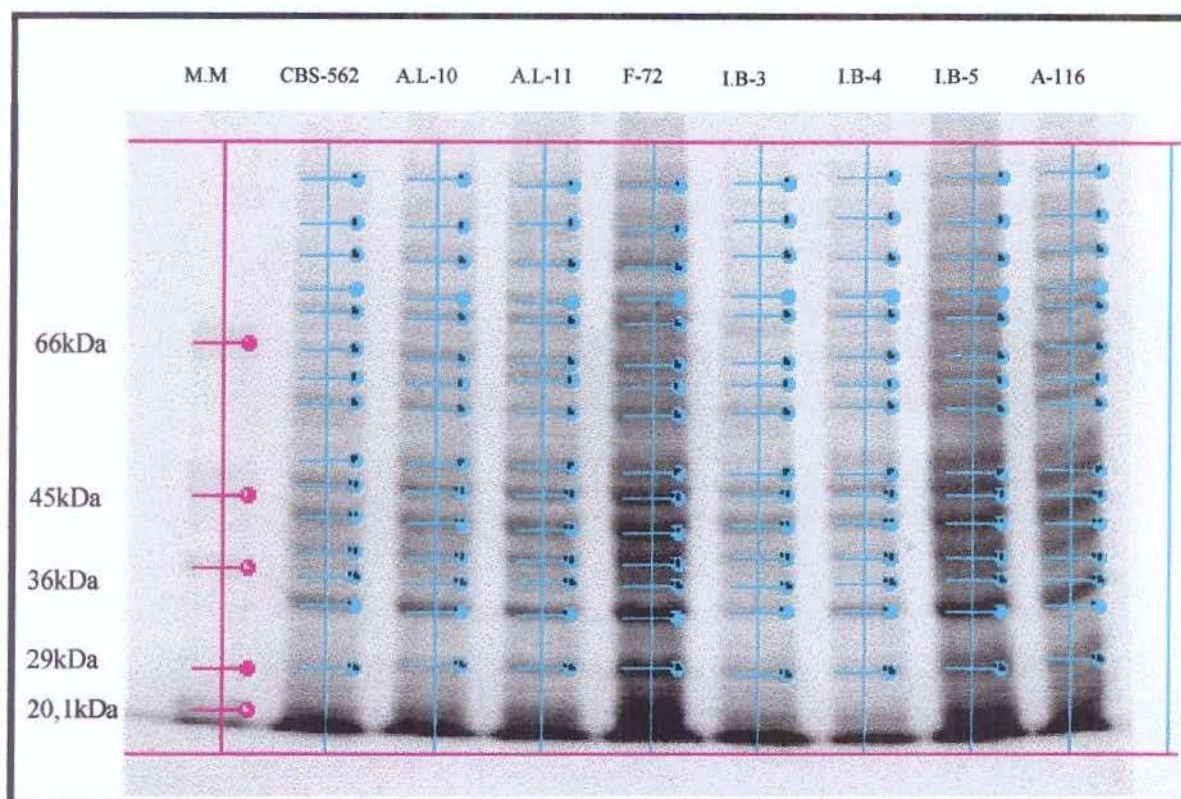
**FIGURA 14:** Dendrograma de similaridade para as linhagens de *C. albicans* isoladas de Saliva.

### 1.3 Perfis Protéicos em SDS-PAGE de amostras de diferentes sítios anatômicos

A eletroforese em gel de poliacrilamida, dos extratos protéicos das 14 linhagens escolhidas aleatoriamente, pertencentes a diferentes sítios anatômicos, permitiram a detecção de perfis contendo aproximadamente 15-20 bandas eletroforéticas, usando-se um marcador de massa molecular variando de 20,1 a 66,0 kDa (Fig. 15 e 16). Os perfis eletroforéticos das linhagens foram muito similares entre si e com a linhagem-padrão CBS-562. Métodos semelhantes também foram conduzidos com as demais linhagens utilizadas em nosso experimento (Tab.1).



**Figura 15.** Perfis protéicos das linhagens de *C. albicans* isoladas de diferentes sítios anatômicos.



**Figura 16. Perfis protéicos das linhagens de *C. albicans* isoladas de diferentes sítios anatômicos.**

#### **1.4 Matriz de Similaridade (S) das 14 amostras pertencentes a diferentes sítios anatômicos, em relação à linhagem- padrão.**

Após o processamento das imagens dos géis, as bandas protéicas da linhagem-padrão de *C. albicans* CBS-562 e das 14 linhagens dos diferentes sítios anatômicos foram convertidas em valores numéricos em relação às respectivas massas moleculares, as quais puderam ser analisadas dois a dois em uma matriz de dados binários.



A utilização do coeficiente de similaridade SM (Simple Matching) possibilitou a construção de uma matriz de similaridade (S), onde se encontram os valores de similaridade das linhagens estudadas, linhagem padrão CBS-562 e demais linhagens de *C.albicans* pertencentes aos diferentes sítios (Tabela 2).

**Tabela.2.** Matriz de similaridade (S) para 14 amostras das linhagens de *Candida albicans* isoladas de diferentes sítios anatômicos juntamente com a linhagem padrão CBS-562.

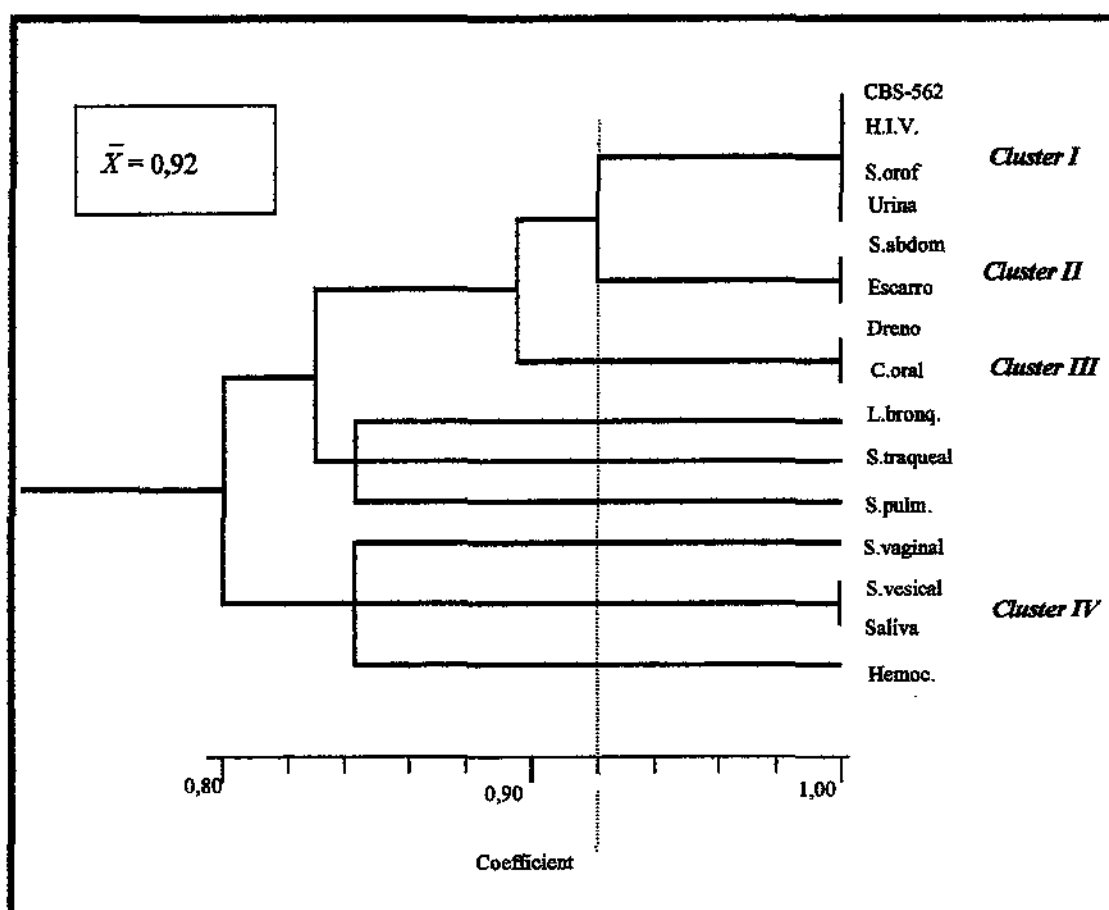
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CBS-562	1,000														
A.L - 1.2	1,000	1,000													
A.L - 15	0,857	0,857	1,000												
A.L - 8.1	0,857	0,857	0,857	1,000											
A.L - 9.1	0,857	0,857	0,857	0,857	1,000										
A.L - 12	1,000	1,000	0,857	0,857	0,857	1,000									
A.L - 4	1,000	1,000	0,857	0,857	0,857	1,000	1,000								
A.L-13.2	0,857	0,857	0,714	0,857	0,714	0,857	0,857	1,000							
A.L - 10	0,929	0,929	0,786	0,786	0,786	0,929	0,929	0,929	1,000						
A.L - 11	0,929	0,929	0,786	0,786	0,786	0,929	0,929	0,786	0,857	1,000					
F - 72	0,929	0,929	0,786	0,786	0,786	0,929	0,929	0,786	0,857	1,000	1,000				
LB - 3	0,929	0,929	0,786	0,786	0,786	0,929	0,929	0,929	1,000	0,857	0,857	1,000			
LB - 4	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,929	0,786	0,786	0,929	1,000		
LB - 5	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,714	0,786	0,786	0,786	0,786	0,857	1,000	
A - 116	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,857	0,714	0,786	0,786	0,786	0,786	0,857	1,000	1,000

### 1.5 Análise do dendrograma de similaridade dos 14 isolados pertencentes aos diferentes sítios anatômicos

As linhagens de *C. albicans* foram analisadas em conjunto, a partir de um único dendrograma (Figura 17), comparando-se a amplitude dos graus de

similaridade, a formação de "clusters" em linha de corte referente ao valor de similaridade média ( $S_{SM}$ ) e os graus de associação para cada linhagem em relação à outra, levando-se em consideração os diferentes sítios anatómicos.

As linhagens de *C. albicans* isoladas de diferentes Sítios Anatômicos mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 80 a 100 (%). Os valores médios de similaridade possibilitaram a formação de quatro "clusters" durante a análise, podendo ser visualizados na Figura abaixo:



**FIGURA 17: Dendrograma final de similaridade para as linhagens de *C. albicans* isoladas de diferentes Sítios Anatômicos.**



## DISCUSSÃO

Proteínas totais (proteínas nativas ou desnaturadas por SDS ), proteínas de membrana celular ou proteínas ribossômicas de bactérias, podem ser analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), sendo a eletroforese descontínua de proteínas solúveis totais desnaturadas (SDS-PAGE), a mais freqüente técnica utilizada em laboratórios de microbiologia.

A análise dos perfis eletroforéticos de proteínas, associadas com sistemas estatísticos computadorizados, tem possibilitado a classificação, identificação, comparação e ainda, a reclassificação de linhagens, espécies e gêneros de bactérias (KESTERS & LEY, 1975; TANNER, 1986; COSTAS *et al.*, 1987) e leveduras (MAIDEN & TANNER, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1992; HÖFLING *et al.*, 1998) em levantamentos taxonômicos e epidemiológicos.

Amostras de *Candida albicans* provenientes da cavidade oral e de outros sítios anatômicos de pacientes diversos, foram analisadas aplicando-se a técnica de SDS-PAGE e análise numérica dos perfis eletroforéticos das bandas protéicas, baseando-se no coeficiente de similaridade Simple Matching (SM) e no método de agrupamento UPGMA, originando dendrogramas de similaridade.

Conforme pode ser observado, os perfis eletroforéticos obtidos a partir de 51 linhagens de *C. albicans* e da linhagem padrão CBS-562, contém, em média, 15 bandas por amostras, dentro de um intervalo de massa molecular de 20,1 kDa e 66,0 kDa. Esses perfis protéicos, quando comparados,

apresentaram-se relativamente similares entre si, com poucas variações intraespecíficas perceptíveis.

Segundo KERSTERS & DE LEY (1975), ROCHELLE *et al.* (1996), condições de crescimento do microrganismo, velocidade de centrifugação dos extratos e condições de eletroforese em gel, podem afetar a reprodutibilidade eletroforética. Todos esses fatores foram observados e padronizados, a fim de minimizar possíveis desvios de reprodutibilidade. Segundo AVISE (1975), os valores mínimos de reprodutibilidade devem ser igual ou superior a 85% ( $S_{SM} \geq 0,850$ ) para que os resultados possam estar dentro dos limites de confiabilidade.

Os dados obtidos em nossas investigações, permitiram, primeiramente, constatar que as amostras de *C. albicans*, de um mesmo sítio anatômico, submetidas a um mesmo gel de eletroforese e comparadas (Figuras 1 a 14), apresentaram valores de similaridade acima de 80% ( $S_{SM} = 0,800$ ). Esses resultados estão em concordância com os trabalhos de SNEATH (1984) e MENDONÇA-HAGLER & HAGLER (1991), onde esses autores preconizaram que os valores  $S_{SM}$  mínimos que suportam o agrupamento dentro de uma mesma espécie, não devem ser menores que 0,800, ou seja, não devem apresentar menos que 80% de similaridade fenotípica.

Nestas mesmas análises, podemos observar que a linhagem-tipo de *C. albicans* (CBS-562) se agrupou com um valor de 100% ( $S_{SM} = 1,0$ ) de similaridade com 13 isolados das 51 amostras estudadas, sendo que 2 amostras pertenciam a materiais de secreções traqueais, 7 de materiais de urina, 3 de secreções vaginais e apenas 1 de material de hemocultura.

O emprego da linhagem-tipo permitiu a identificação dos "clusters" ao nível de espécie, já que as amostras agruparam-se com a linhagem-tipo com

um grau de similaridade acima de 80%, valor considerado limítrofe no agrupamento intraespecífico entre amostras e linhagem-tipo (MENDONÇA-HAGLER & HAGLER, 1991; VANCANNEYT, 1992). Reafirmando a potencialidade da técnica de SDS-PAGE de proteínas totais, na identificação de leveduras quando confrontadas com a linhagem-tipo.

As amostras de *C. albicans*, foram analisadas inicialmente dentro de seus respectivos sítios anatômicos. Os dendrogramas cortados por traços perpendiculares dispostos nos pontos de similaridade média, encerram vários "clusters" mistos contendo múltiplos isolados para cada sítio anatômico, com coeficiente de similaridade  $S_{SM} \geq 0,800$  ou 80%. Esses resultados nos permitiram demonstrar não haver diferenças qualitativas entre os isolados, uma vez que fornecem perfis reprodutíveis idênticos ou muito similares, quando comparados, conforme expressos nas Figuras de 1 a 14, sugerindo serem essas linhagens, se não idênticas, muito próximas.

Os dados obtidos da avaliação das linhagens em conjunto, onde se determinou a reprodutibilidade tomando-se o valor de similaridade que forma os "clusters" com as repetições dentro de um dendrograma final (Figura 17), envolvendo a linhagem-tipo CBS-562 juntamente com 14 das amostras analisadas, (uma de cada sítio anatômico) escolhidas aleatoriamente, permitiram observar pequenas diferenças nas bandas protéicas exibidas por essas 15 amostras, demonstrando, em princípio, um alto grau de similaridade entre as linhagens, quando comparadas.

Em relação às composições dos "clusters", a técnica de eletroforese de proteínas totais permitiu o arranjo dos isolados dos diferentes sítios anatômicos em grupos distintos, com coeficientes de similaridade média  $S_{SM}$

$\geq 0,92$  ou 92%, onde pode-se observar a formação de 4 grupos entre os isolados de *C. albicans*, num grau de similaridade de  $S_{SM}= 1,000$  ou 100%. A linhagem-tipo de *C. albicans* (CBS-562) se agrupou num grau de similaridade de 100% entre os 3 isolados de *C. albicans* provenientes dos diferentes sítios: material da cavidade oral de paciente imunocomprometido (H.I.V), secreção de orofaringe e urina, os quais formaram o grupo I; os isolados de material de secreção abdominal e escarro formaram o grupo II; o grupo III foi formado pelas amostras de secreções, cavidade oral e secreção de dreno, e finalmente o grupo IV foi formado pelas linhagens dos sítios: secreção pulmonar, saliva e sonda vesical. Como podemos observar, 4 isolados provenientes de secreção traqueal, secreção vaginal, lavado brônquico e hemocultura não se agruparam com as outras linhagens.

Esses resultados sugerem que a composição desses "clusters" independem da origem do sítio anatômico e dos indivíduos comparados neste experimento, o que já havia sido apontado por VANCANNEYT *et al* (1991), onde agruparam através da técnica de SDS-PAGE, seis linhagens de *C. albicans*, com  $S_{SM}= 0,950$  de similaridade média. Nesta mesma linha de investigação, PUJOL *et al* (1997) empregaram as técnicas de RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso), MLEE (Eletroforese de Enzima Multilocus) e RFLP (Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição) com hibridização pelas sondas Ca3 e CARE2 na análise epidemiológica de isolados clínicos de *C. albicans* de origens diversas, concluindo que, somente os isolados estritamente relacionados (isolados de parceiros sexuais ou isolados de diferentes sítios anatômicos de um mesmo indivíduo) podem combinar-se com  $S_{AB} \geq 0,94$  dentro de "clusters", mesmo

incluindo-se linhagens não relacionadas. Esses resultados, aparentemente divergem daqueles obtidos em nossos estudos, uma vez que as nossas amostras demonstraram um alto grau de similaridade independentemente de seus sítios anatômicos e indivíduos, quando o perfil de SDS-PAGE foi analisado. GOMES (1995), trabalhando com linhagens de leveduras da mesma espécie de *Saccharomyces*, provenientes de diversas indústrias alcooleiras, submetidas a quatro métodos na caracterização dessas linhagens, tais como: meios diferenciais, eletroforese de proteínas - SDS-PAGE, separação de cromossomos (CHEF) e RAPD, observou que quando se tratava de caracterizar linhagens da mesma espécie, como no caso das linhagens da indústria alcooleira, que apresentaram alta similaridade, o método de RAPD mostrou-se o mais eficiente, devido ao alto número de características fornecidas por este métodos. Além disso, chegou à conclusão de que a associação de dois métodos como SDS-PAGE e RAPD seria o ideal para a caracterização de linhagens pertencentes à mesma espécie.

Vários estudos levados a efeito em nossos laboratórios nesta linha de investigação, com proteínas de células leveduriformes, empregando-se o método de SDS-PAGE, associado à sistemas estatísticos computadorizados (análise numérica), tem contribuído para o entendimento sobre o uso destes métodos, no que se diz respeito à padronização das técnicas de cultivo, isolamento, extração de proteínas e análise do perfil eletroforético dessas células, com ênfase nos estudos de caracterização, sistemática e epeidemiologia desses organismos. (HOFLING *et al.*, 1997; HÖFLING *et al.*, 1998; HÖFLING *et al.*, 1999; ROSA, 1997; ROSA *et al.*, 2000; BORIOLO, 2000). Estes estudos, associados àqueles da literatura disponível, permitem considerar que: a) a padronização destas técnicas - de

modo geral - não são sempre compatíveis, b) meios de cultivo e processos de extração das proteínas, podem influenciar os resultados para aplicação nos estudos de relações de afinidade entre espécies, c) o uso de diferentes técnicas moleculares onde se analisam diversos componentes celulares como proteínas, isoenzimas, DNA, RNA, etc., d) aliado à diferenças nos critérios de análise numérica baseados nos perfis eletroforéticos, indicam que não há possibilidade de se comparar resultados tão diversificados, a não ser aqueles que forem submetidos ao mesmo tratamento.

Os dados coligidos nesta investigação, no entanto, abrem perspectivas para outros estudos que permitam o uso de outros componentes celulares, submetidos às diversas técnicas moleculares disponíveis, com ênfase na caracterização de linhagens pertencentes à mesma espécie.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que:

- A análise dos perfis eletroforéticos de extratos protéicos de isolados de *Candida albicans* da cavidade bucal e outros sítios anatômicos de humanos, originaram diversos dendrogramas, permitindo o agrupamento dos isolados em "clusters" representativos da espécie.

- As amostras de *C. albicans*, de um mesmo sítio anatômico, quando comparadas, apresentam valores de similaridade acima de 80% ( $S_{SM} = 0,800$ ), os quais suportam o agrupamento dentro de uma mesma espécie.

- Das amostras de *C. albicans* em conjunto, envolvendo a linhagem-tipo CBS-562, juntamente com 14 das amostras analisadas (uma de cada sítio anatômico) escolhidas aleatoriamente, apresentam um alto grau de coeficiente de similaridade, quando comparadas.

- A composição dos "clusters" presentes nos dendrogramas resultantes da análise numérica dos perfis protéicos das diversas amostras analisadas, independem dos fatores estudados, como sítios anatômicos e indivíduos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; *et al.* *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 245p.
- ALMEIDA, N. Q. *Influência da produção de hialuronidase, protease, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de Candida sobre a patogenicidade de camundongos*. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, 1991. 111p.
- AMES, G. F. L. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. *J. Biol.Chem.*, Baltimore, 249:634-644, 1974.
- ANTONSSON, B. *et al.* Protein kinase C in yeast. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 269: 16821-16828, 1994.
- ASAKURA, K. *et al.* Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J. gen. Microbiol.* Cambridge, 137: 2531-2538, 1991.
- AVISE, J. C. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, Washington, 23: 465-481, 1975.
- AYALA, F. J. *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets, 1976. 315p.



- BARNS, S. M. *et al.* Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bact.*, Washington, 173: 2250-2255, 1991.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *A. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 22:87-108, 1968.
- BERIAM, L. O. S. ; BENEDETTI, C. E.; ALMEIDA, I. M. G.; ROBBS, C. F. Análise eletroforética de alguns isolados de *Agrobacterium tumefaciens*, *A. radiobacter* e *A. rhizogenes*. *Summa Phytopathol.*, 17: 9, 1991.
- BORIOLLO, M. G. *Análise numérica do perfil eletroforético de proteínas totais de isolados orais de Candida albicans (BERKHOUT, 1923) provenientes de escolares de diferentes categorias socioeconômicas.* Piracicaba, 2000. [ Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. *Analyt. Biochem.*, Orlando, 72: 248-254, 1976.
- BRUNEAU, S. & GUINET, R. Rapid identification of medically important yeasts by electrophoretic protein patterns. *FEMS Microbiol. Lt.*, Amsterdam, 58:329-334, 1989.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infection. *Acta odont. Scand.*, Oslo, 48(1): 61-69, Feb. 1990.

- CARLE, G. F. & OLSON, M. V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field – alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 12 (14): 5647-64, 1984.
- CARLE, G. F. & OLSON, M. V. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proceedings of the National Academy of Science United States of American*, Washington, 82: 3756-60, 1985.
- CARLILE, M. J. & WATKINSON, S. C. *The fungi*. London: Academic Press Limited, 1994. 482p.
- CARLSON, R. R. & VIDAVER, A. K. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 315-326, 1982.
- CASANOVA, M. & CHAFFIN, W. L. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J. gen. Microbiol.*, Cambridge, 137: 1045-1051, 1991.
- CAUGANT, D. A. & SANDVEN, P. Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis. *J. clin. Microbiol.*, Washington, 31: 215-220, 1993.
- COSTAS, M.; HOLMES, B.; WOOD, A. C. & ON, S. L. W. Numerical analysis of electrophoretic patterns of *Providencia rettgeri* from human faeces, urine and other specimens. *J. appl. Bact.*, Reading, 67: 441-452, 1989a.

- COSTAS, M.; SLOSS, L. L.; OWEN, R. J. & GASTON, M. A. Evaluation of numerical analysis of SDS-PAGE of protein patterns for typing *Enterobacter cloacae*. *Epidemiol. Inf.*, London, 103: 265-274, 1989b.
- COSTAS, M.; HOLMES, B. & SLOSS, L.L. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Providencia rustigianii* strains from human diarrhoea and other sources. *J. appl. Bact.*, Reading, 63:319-328, 1987.
- CORREA, B. *Avaliação da eficácia do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de amostras de leveduras não encapsuladas (Candida albicans) e capsuladas (Cryptococcus neoformans)*. Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-USP, 1984. 115p.
- DAVIS, M. J.; ASPIE Jr., A.G.; VIDAVER A. K.; HARRIS, R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria including *Clavibacter xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int. J. Sist. Bacteriol.*, 34: 107-117, 1984.
- ESTEVES, J. A. L.; CABRITA, J. D. & NOBRE, G. N. *Micologia médica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977. 115p.

- EZE, J. M. O. & DUMBROFF, E. B. A comparison of the Bradford and Lowry methods for the analysis of protein in chorophyllous tissue. *Can. J. Bot., Ottawa*, 60: 1046-1049, 1982.
- FARRIS, J. S. On the cophenetic correlation coefficient. *Syst. Zool.*, Washington, 18: 279-285, 1969.
- GOMES, L. H. *Avaliação de quatro métodos para a caracterização de leveduras*. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- USP, 1995. 89p.
- GORDON, M. A.; ELLIOTT, J. C. & HAWKINS, T. W. Identification of *Candida albicans*, other *Candida* species and *Torulopsis glabrata* by means of Immunofluorescence. *Sabouraudia*, Oxfordshire, 5: 323-328, 1967.
- HALL, R. Electrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungi and algae. *Bull. Torrey Bot. Club* 100: 253-259, 1973.
- HALL, R. Molecular approaches to taxonomy of fungi. *Bot. Rev.*, Lancaster, 35: 285-304, 1969
- HÖFLING, J. F.; CAMPOS, A. S.; PEREIRA, C. V.; ROSA, R. T.; ROSA, E. A. R. Preliminary characterization and grouping of *Candida* species by numerical analysis of protein profiles obtained by polyacrylamide gel electrophoresis. *Rev. Iberoamer. Micol* 16: 27-29, 1999.
- HÖFLING, J. F.; ROSA, E. A. R.; ROCHELLE, S. L. A.; SPOLIDORIO, D. M. P.; MOREIRA, D. Numerical analysis variations of SDS-PAGE

- protein patterns using different culture media for the cultivation of *Candida* from the oral cavity. **Rev. Microbiol**, São Paulo, 28: 79-84, 1998.
- HÖFLING, J. F. *et al.* Avaliação de diferentes metodologias para extração de proteínas intracelulares de leveduras do gênero *Candida*. **Rev. Ciênc. Tecnol.**, Piracicaba, vol. 5/2: 67-77, 1997.
- HOLMES, B.; COSTAS, M. & SLOSS, L. L. Numerical analysis of SDS-PAGE protein patterns of *Serratia marcescens*: a comparison with other typing methods. **Epidemiol. Inf.**, London, 105: 107-117, 1990.
- HUISINGH, D. & DURBIN, R. D. Acrylamide-gel electrophoresis of protein from *Agrobacterium* species. **Phytopathology**, 55: 1062, 1965.
- HUISINGH, D. & DURBIN, R. D. Physical and physiological methods for differentiating among *Agrobacterium rhizogenes*, *A. tumefaciens* and *A. radiobacter*. **Phytopathology**, 57: 922-923, 1967.
- JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In GOODFELLOW, M.; & MINNIKIN, D. E., ed. **Chemical methods in bacterial systematics**. London, Academic Press, 1985. P. 115-128.
- JEGANATHAN, S., CHAN, Y. C. Immunodiagnosis in oral candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, 74: 451-4, 1992.
- JENKINS, W.M. *et al.* Nutricional deficiency in oral candidosis. **Int. J. oral Surg.**, Copenhagen, 6(4): 204-10, 1977.

- JOLY, S. *Levantamento de leveduras ocorridas em frutos maduros: sua posição sistemática*. Tese (Doutoramento) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- USP, 1954. 154p.
- JONES, M. G. & NOBLE, W. C. An electrophoretic study of enzymes as a tool in the taxonomy of the dermatophytes. *J. gen. Microbiol.*, Cambridge, 120: 1101-1107, 1982.
- KEMP, G. & SOLOTOROVSKY, L. Localization of antigens in mechanically disrupted cells of certain of the genera *Candida* and *Torulopsis*. *J. Immun.*, Baltimore, 93: 305-314, 1963.
- KERSTERS, K. Numerical methods in the classification of bacteria by protein eletrophoresis. *In*: GOODFELLOW, M.; JONES, D. & PRIEST, F. G. *Computer-assisted bacterial systematics*. London: Academic Press Limited, 1985. p. 337-368.
- KERSTERS, K. & DE LEY, J. Classification and identification of bacteria by eletrophoresis of their proteins. *In*: GOODFELLOW, M. & BOARD, R. G, ed. *Microbial classification and identification*, London, Academic Press, 1980. P. 273-94.
- KERSTERS, K. & DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic proteins patterns. *J Gen Microbiol*, Cambridge, 87: 333-42, 1975.
- KREGER VAN RIJ, N. J. W. *The yeast: a taxonomic study*. North Holland Pul., Amsterdam, 1984. 1081p.

- KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. I., 1984.
- LACAZ, C.S. *Candidiases*. São Paulo: EPU-EDUSP, 1980. 190p.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, London, 227: 680-685, 1970.
- LEHMANN, P. F.; KEMKER, B. J.; HSIAO, C. B.; DEV, S. Isoenzyme biotypes of *Candida* species. *J. clin. Microbiol.*, Washington, 27: 2514-21, 1989b.
- LENNETTE, E. H. *et al.* *Manual de microbiologia clínica*. 4 ed. Buenos Aires: Méd. Panamericana, 1987. 228p.
- LEWONTIN, R. C. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York, 1974.
- LODDER, J., KREGER-VAN-RIJ, N. J. W. *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1952.
- MACDONELL, M. T. & COLWELL, R. R. The contribution of numerical taxonomy to the systematics of Gram-negative bacteria. In: GOODFELLOW, M.; JONES, D. & PRIEST, F. G. *Computer-assisted bacterial systematics*. London: Academic Press Limited, 1985, p. 107-136.
- MAIDEN, M. F. J. & TANNER, A. Identification of oral yeasts by polyacrylamide gel electrophoresis. *Oral microbiol. Immun.*, Copenhagen, 6: 187-190, 1991.

- MARGULIS, L. Wittaker's five kingdoms of organisms: minor revisions suggested by consideration of the origin of mitosis. *Evolution*, 25: 242-245, 1971.
- MASON, M. M; LASKER, B. A. & RIGGSBY, W. B. Molecular probe for identification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata*. *J. clin. Microbiol.*, Washington, 25: 563-566, 1987.
- MATSUOKA, M.; ASOU, S.; OHASHI, Y. Regulation mechanisms of the synthesis of pathogenesis – regulated protein in tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology*, Kyoto, 29: 1185-92, 1988.
- MENDONÇA-HAGLER, L. C. & HAGLER, A. N. Taxonomia de microrganismos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, C. R.; AZEVEDO, J. L. ed. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo, Manole, 1991. Vol.2.
- MONOD, M. *et al.* The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J. Med. Microbiol.*, Harlow, 32: 123-129, 1990.
- NEDER, R. N. *Microbiologia. Manual de laboratório*. São Paulo: Livraria Nobel, 1992. 138p.
- NEI, M. *Molecular polymorfism and evolution*. Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1975. 318p.
- NEVO, E.; BEILES, A. & BEN-SHLOMO, R. The evolutionary significance of genetic diversity: Ecologic, demographic and life history correlates. *Lect. Notes Biomath.* 53: 13-213, 1980.



- PONTON, *et al.* Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, Washington, 61: 4842-4847, 1993.
- PUJOL, C. *et al.* Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, 35: 2348-58, 1997.
- RATTAZZI, M. C.; SCANDALIOS, J. G. & WHITT, G. S. *Isozymes: Current topics in biology and medical research*. Vol. 10. Genetic and evolution. New York: Alan R. Liss Inc., 1983. 89p.
- ROCHELLE, S. L. A. *Influência do meio de cultura na extração de proteínas intracelulares de leveduras do gênero Candida isoladas da cavidade oral para aplicação em SDS-PAGE*. Tese (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, 1996. 152p.
- ROSA, E. A. R.; ROSA, R. T.; PEREIRA, C. V.; BORIOLO, M. F. G.; HÖFLING, J. F. Analysis of parity between protein-based electrophoretic methods for the characterization of oral *Candida* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95(6): 801-806, 2000.
- ROSA, E. A. R. *Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e análise numérica de leveduras isoladas da cavidade oral de humanos*. Piracicaba, 1997. [Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].

- SCHECHTER, Y. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. IV. Electrophoresis and taxonomy of medically important fungi. *Bull. Torrey bot. Club*, New York, 100: 277-287, 1973.
- SCHERER, S. & STEVENS, D. A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. clin. Microbiol.*, Washington, 25: 675-679, 1987.
- SELANDER, R. K. & WHITTAM, T. S. Protein polymorphism and the genetic structure of populations. In: NEI, M. & KOEHN, R. K. *Evolution of genes and proteins*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets, 1983.
- SHECHTER, Y. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. I V. Electrophoresis and taxonomy of medically important fungi. *Bull. Torrey bot. Club*, New York, 100: 277-287, 1973.
- SHECHTER, Y.; LANDAU, J. W. & DABROWA, N. Comparative electrophoresis and numeral taxonomy of some *Candida* species. *Mycologia*, Lancaster, 64: 841-853, 1972.
- SHEN, H. D. *et al.* Differential identification of *Candida* species and other yeasts by analysis of [ <sup>35</sup>S ] – metionine labeled polypeptide profiles. *Analyt. Biochem.*, Orlando, 175: 548-551, 1988.
- SKINNER, C. E. & FLETCHER, D. W. A review of the genus *Candida*. *Bact. Rev.*, Washington, 24: 397-416, 1960.

- SNEATH, P. H. A. Bacterial classification II – Numerical Taxonomy. In: KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol I. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, p. 5-7.
- SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. Q. *Numerical taxonomy*. San Francisco: Freeman, 1973. 482p.
- SNEATH, P. H. A. & JOHNSON, R. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. *J. gen. Microbiol.*, Cambridge, 72: 377-392, 1972.
- SPENCER, J. F. T. & GORIN, P. A. J. Systematics of the genus *Candida* Berkhout: proton magnetic ressonance spectras of the mannans and mannose-containing polysaccharides as an aid in classification. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, 35: 33-44, 1969.
- STENDERUP, A. Oral mycology. *Acta odont. Scand.*, Oslo, 48(1): 3-10, Feb. 1990.
- TANNER, A. C. R. *et al.* *Bacteroides forsythus* sp nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp from the human oral cavity. *Int. J. syst. Bact.*, Washington, 36: 213-221, 1986.
- TAVARES, F. C. A; ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L. H.; SOUBIHE, M. Identificação molecular de leveduras da fermentação alcoólica. *STAB*, Piracicaba, 10 (4): 34-9, 1992.

- TRAN VAN KY, P., BIQUET, J. ANDRIEU, S. Etude par l'électrophorèse et al double diffusion en gelose des substances antigeniques excretées dans le milieu de culture de *Candida albicans*. *Sabouradia*, 2:164-70, 1963.
- TSUCHIYA, T. et al. Studies on the classification of the genus *Candida*. *Japan. J. exp. Med.*, Tokyo, 25: 75-83, 1955.
- VAN CANNEYT, M. et al. The application of whole-cell protein electrophoresis for the classification and identification of basidiomycetous yeast species. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, 61: 69-78, 1992.
- VAN CANNEYT, M. et al. Differentiation of yeasts species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Syst. appl. Microbiol.*, Stuttgart, 14: 23-32, 1991.
- VAN DER WALT, J. P. Criteria and methods used in classification. In: LODDER, J. ed. *The Yeast*. Amsterdam, North Holland, p. 34-113 1970.
- VAN VUUREN, H. J. J. & VAN DER MEER, L. Fingerprinting of yeast by proteins eletroforesis. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, 38: 49-53, 1987.
- WALTERS, M. G. & BLOBEL, G. Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. *J. Cell. Biol.*, New York, 102: 1543-1550, 1986.
- WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, Washington, 163: 150-160, 1989.

- WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163: 150-160, 1969.
- WOONTNER, M. & JAEHNING, J. A. Accurate initiation by RNA polymerase II in a whole cell extract from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 265: 8979-8982, 1990.
- YAMAZAKY, M. & KOMAGATA, K. Taxonomic significance of electrophoretic comparasion of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodosporidium*. *Int. J. Bact.*, Washington, 31: 361-381, 1981.

## APÊNDICE

### 1. Meios de Cultura

#### 1.1 Meio completo para leveduras (MCL)

peptona.....	10 g
extrato de levedura.....	10 g
glucose.....	20 g
fosfato dibásico de potássio.....	0,5g
ágar.....	20 g
água destilada.....	qsp 1000 mL

Adicionar todos os componentes da formulação à água em ebulição. Uma vez dissolvidos os componentes, fracionar alíquotas de 10 mL em tubos de cultura e autoclavar a 120°C, sob 1 atm, por 20 minutos. Inclinar os tubos enquanto o meio estiver liquefeito.

#### 1.2 Yeast peptone dextrose (YPD)

extrato de levedura.....	10 g
peptona.....	20 g
glucose.....	20 g
água destilada.....	qsp 1000 mL

Adicionar todos os componentes da formulação à água, sob agitação. Uma vez dissolvidos os componentes, fracionar alíquotas de 50 mL, em frascos de Erlenmeyer e autoclavar a 120° C, sob 1 atm, por 20 minutos.

## 2. Soluções para Eletroforese

### 2.1 Componentes acrílicos: acrilamida/Bis (30% T; 2,6% C)

acrilamida.....38,9 g

Bisacrilamida.....1,1 g

Adicionar os componentes a 100 mL de água destilada e agitar até completa dissolução. Filtrar e armazenar em frascos âmbar, em refrigerador.

### 2.2 Gel separador 10%

Tris-HCl pH 8,9.....5 mL

solução de acrilamida.....5 mL

SDS 10%.....200 µL

persulfato de amônia 10%.....50 µL

TEMED.....38 µL

água destilada.....10 mL

Formulação suficiente para dois géis.

### 2.3 Gel concentrador 4%

Tris-HCl pH 6,7.....2,5 mL  
solução de acrilamida.....1 mL  
SDS 10%.....100 µL  
persulfato de amônia 10%.....100 µL  
TEMED.....20 µL  
água destilada.....5,5 mL  
Formulação suficiente para dois géis.

### 2.4 Persulfato de amônia 10%

persulfato de amônia.....0,1 g  
Dissolver o persulfato em qsp 1 mL de água destilada. Preparar no momento do uso.

### 2.5 Reagente de BRADFORD (1976)

Coomassie Brilliant Blue.....200 mg  
Metanol ou Etanol.....50 mL  
Ácido fosfórico 85% .....100 mL  
Água destilada.....q.s.p. 1.000 mL



## 2.6 SDS 10%

SDS.....10 g

Dissolver o SDS em qsp 100 mL de água destilada, sem muita agitação. Armazenar em temperatura ambiente.

## 2.7 Solução Corante

Coomassie blue G 250.....2 g

metanol..... 225 mL

ácido acético.....50 mL

água destilada.....225 mL

## 2.8 Solução descorante

metanol.....35 mL

ácido acético.....25 mL

água destilada.....qsp 500 mL

## 2.9 Tampão extrator de ALFENAS *et al.* (1991)

2-mercaptoetanol.....2 mL

SDS.....2 g

azul de bromofenol.....0,025 g  
glicerol.....20 mL  
Tris-HCl pH 6,8.....qsp 100 mL

## 2.10 Tampão do gel separador (running gel)

Tris.....36,3 g

Dissolver o Tris em 50 mL de água destilada previamente aquecida. Após o resfriamento, titular com HCl concentrado até pH 8,9. Completar o volume até 100 mL. Armazenar em frascos âmbar e temperatura ambiente.

## 2.11 Tampão do gel concentrador (stancking gel)

Tris.....6 g

Dissolver o Tris em 50 mL de água destilada previamente aquecida. Após o resfriamento, titular com HCl concentrado até pH 6,7. Completar o volume até 100 mL. Armazenar em frascos âmbar e temperatura ambiente.

## 2.12 Tampão de tanque, pH 8,9 (1x)

Tris.....6,32 g

glicina.....3,99 g

SDS 10%.....10 mL

água destilada.....qsp 1000 mL

Dissolver os componentes da formulação no momento do uso.